

EPUS

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 F874-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P98/03476	国際出願日 (日.月.年) 04.08.98	優先日 (日.月.年) 04.08.97
出願人(氏名又は名称) 東燃株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 5 ページである。

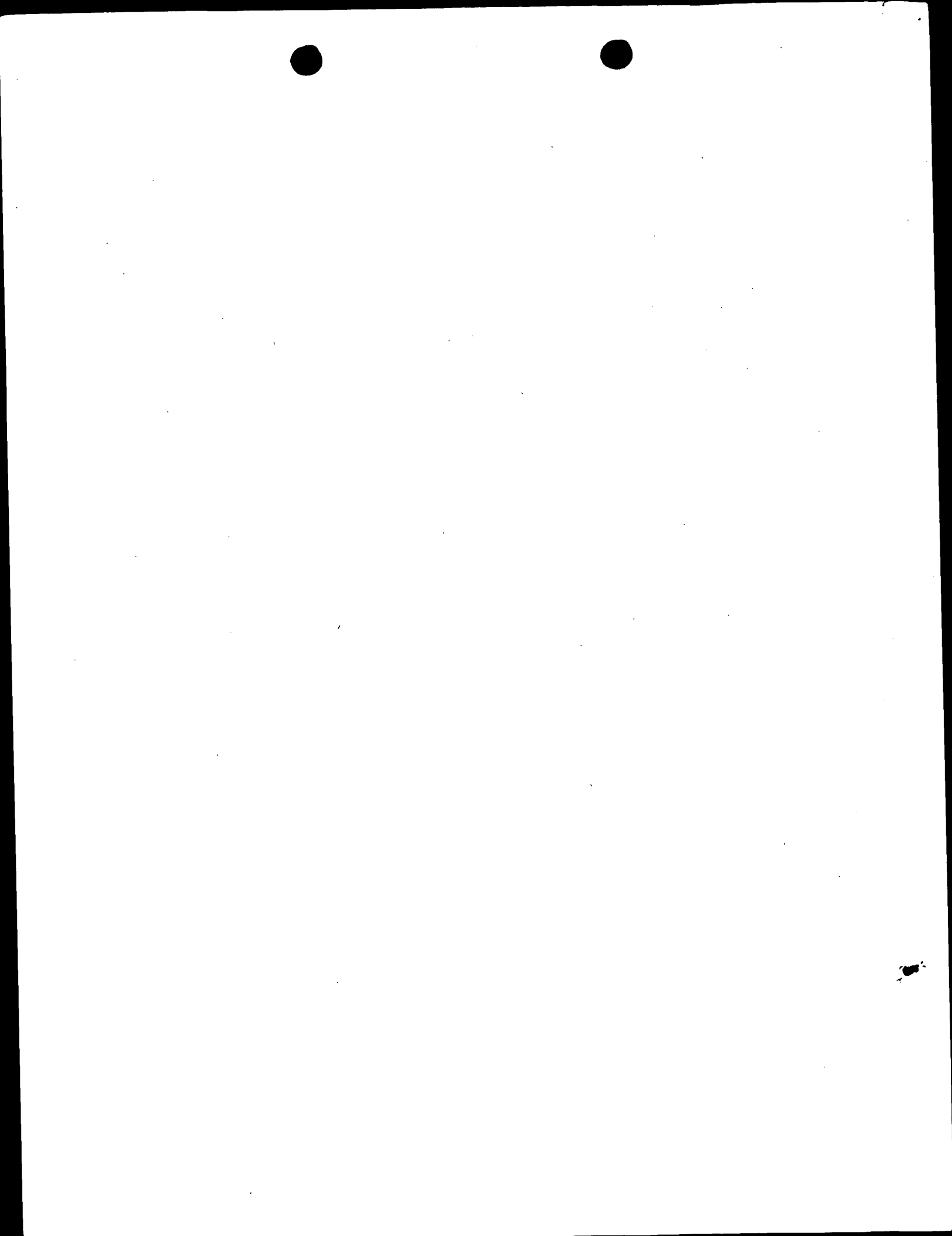
☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。
2. ☒ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。
3. ☐ この国際出願は、ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。
 - ☐ この国際出願と共に提出されたもの
 - ☐ 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの
 - ☐ しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を越える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない
 - ☐ この国際調査機関が書換えたもの

4. 発明の名称は
 - ☒ 出願人が提出したものを承認する。
 - ☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は
 - ☒ 出願人が提出したものを承認する。
 - ☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 6 図とする。
 - ☒ 出願人が示したとおりである。
 - ☐ 出願人は図を示さなかった。
 - ☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。
 - ☐ なし



第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの1の続き)

法第8条第3項-(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの2の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

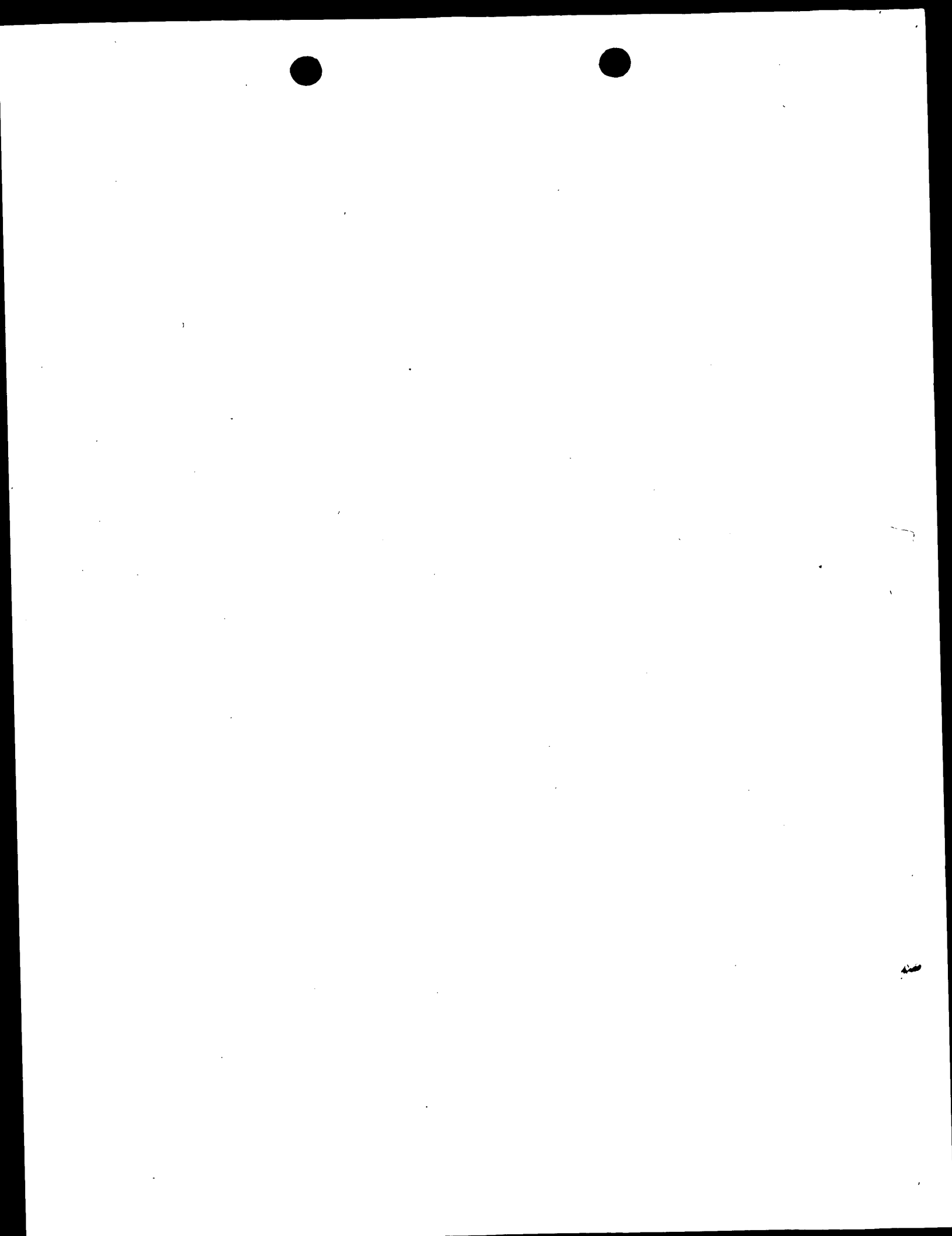
I, 請求の範囲1-12, 15-17, 19-29は、界面活性剤等の特定の試薬を含むウイルス検体の処理法又はウイルス検体の免疫測定法、前記方法に使用するキットである。

II, 請求の範囲13, 14, 18はハイブリドーマ、前記ハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体及び前記モノクローナル抗体を使用した測定キットである。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl.⁸ G01N33/569, G01N33/576

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ G01N33/569, G01N33/576

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-1998年

日本国登録実用新案公報 1994-1998年

日本国実用新案登録公報 1996-1998年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 8-50133, A (東レ株式会社) 20. 2月. 1996 (20. 02. 96) 特許請求の範囲、【0019】-【0023】 (ファミリーなし)	1, 4, 9-12, 15-17, 19, 22, 25-29
A		2, 3, 5-8, 20, 21, 23, 24
X	JP, 8-29427, A (東燃株式会社) 2. 2月. 1996 (02. 02. 96) 特許請求の範囲、【0016】、【0087】 & EP, 717104, A	13, 14, 18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 10. 98

国際調査報告の発送日

10.11.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

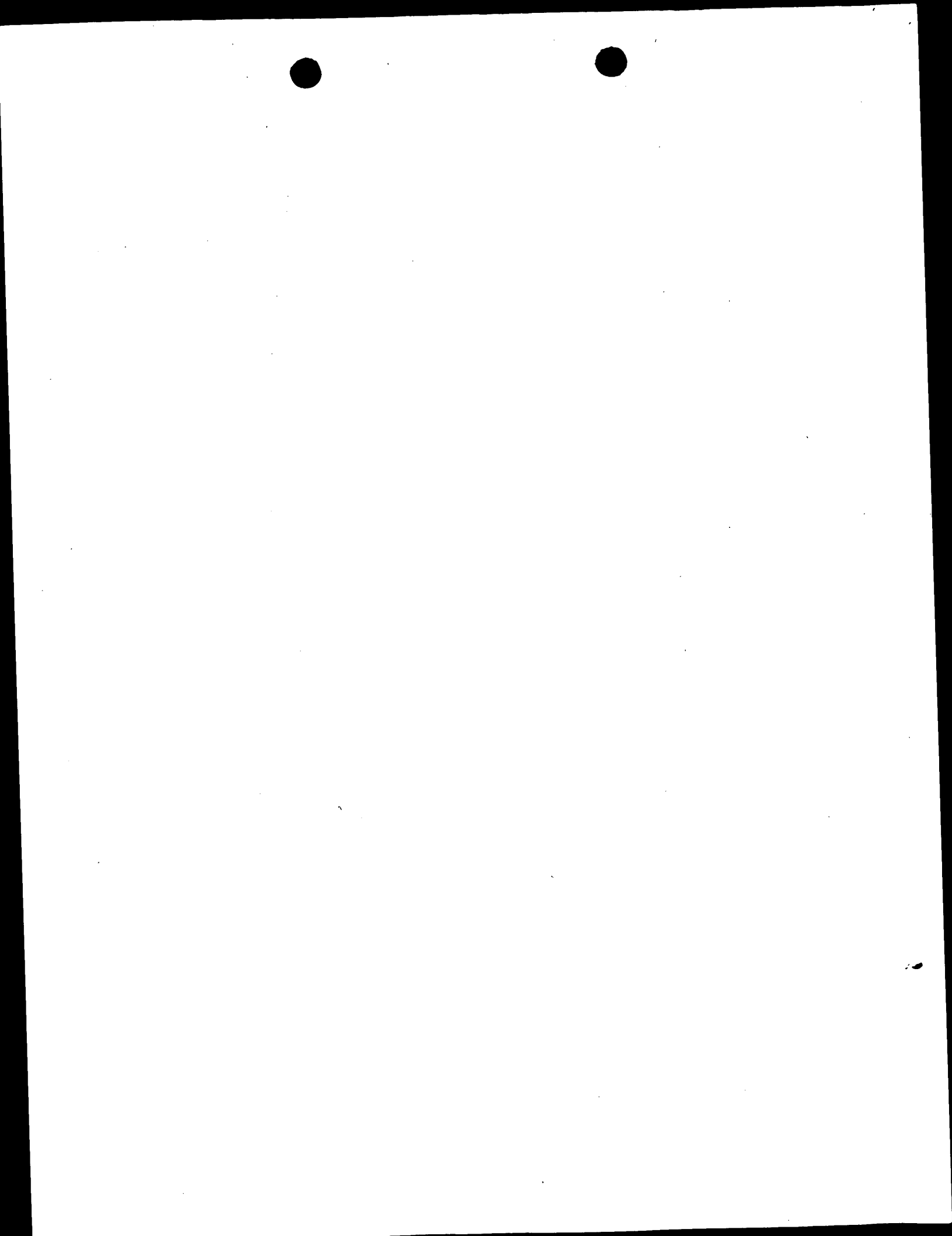
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村祥子

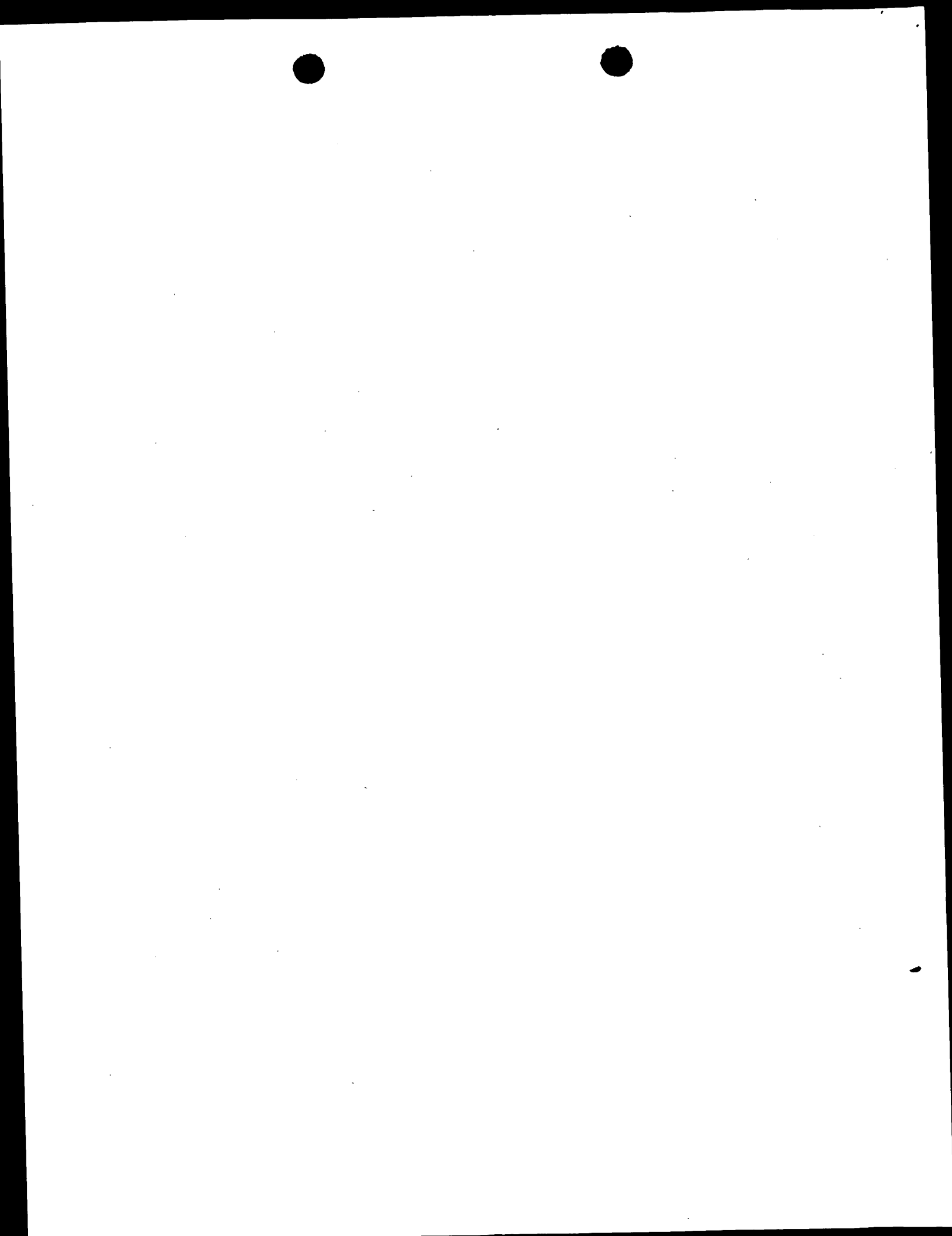
2J 9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3252



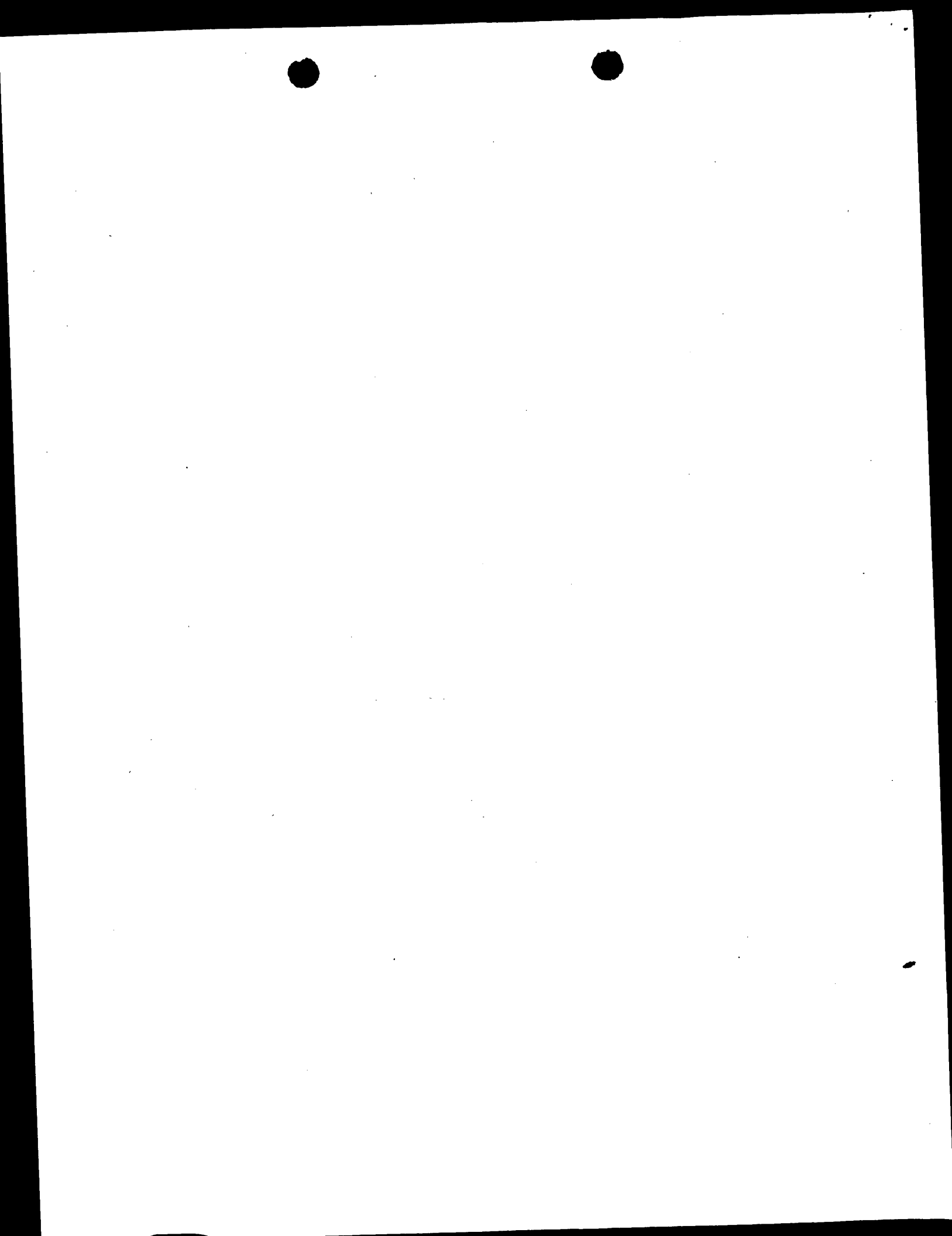
C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 53-104724, A (株式会社ミドリ十字) 12. 9 月. 1978 (12. 09. 78) (ファミリーなし)	1-29
A	JP, 63-185996, A (アボット・ラボラトリーズ) 1. 8月. 1988 (01. 08. 88) & EP, 272483, A	1-29



第II欄の続き

グループ I の特別な技術的特徴はウイルスを含む検体の処理または前記検体の免疫測定法において界面活性剤等の特定の試薬で処理すること又は前記試薬を測定時に含有させる点であり、グループ II の特別な技術的特徴はハイブリドーマ及び前記ハイブリドーマから得られたモノクローナル抗体そのものである。そして、これらの発明群の間に 1 又は 2 以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的關係があるとは認められない。



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03476

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ G01N33/569, G01N33/576

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ G01N33/569, G01N33/576

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-1998
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-1998	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-1998

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 8-50133, A (Toray Industries, Inc.), 20 February, 1996 (20. 02. 96), Claims ; Par. Nos. [0019] to [0023] (Family: none)	1, 4, 9-12, 15-17, 19, 22, 25-29
A		2, 3, 5-8, 20, 21, 23, 24
X	JP, 8-29427, A (Tonen Corp.), 2 February, 1996 (02. 02. 96), Claims ; Par. Nos. [0016], [0087] & EP, 717104, A	13, 14, 18
A	JP, 53-104724, A (The Green Cross Corp.), 12 September, 1978 (12. 09. 78) (Family: none)	1-29
A	JP, 63-185996, A (Abbott Laboratories), 1 August, 1988 (01. 08. 88) & EP, 272483, A	1-29

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ Sec patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
27 October, 1998 (27. 10. 98)Date of mailing of the international search report
10 November, 1998 (10. 11. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03476

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

I. The group of inventions as set for in claims 1 to 12, 15 to 17 and 19 to 29 relates to methods for treating virus samples containing specific reagents such as surfactants or methods for immunologically assaying virus samples and kits to be used in these methods.

II. The group of inventions as set forth in claims 13, 14 and 18 relates to a hybridoma, a monoclonal antibody produced by this hybridoma, and an assay kit with the use of this monoclonal antibody.

- The technical features of group I reside in that in treating or
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
 2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

 4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

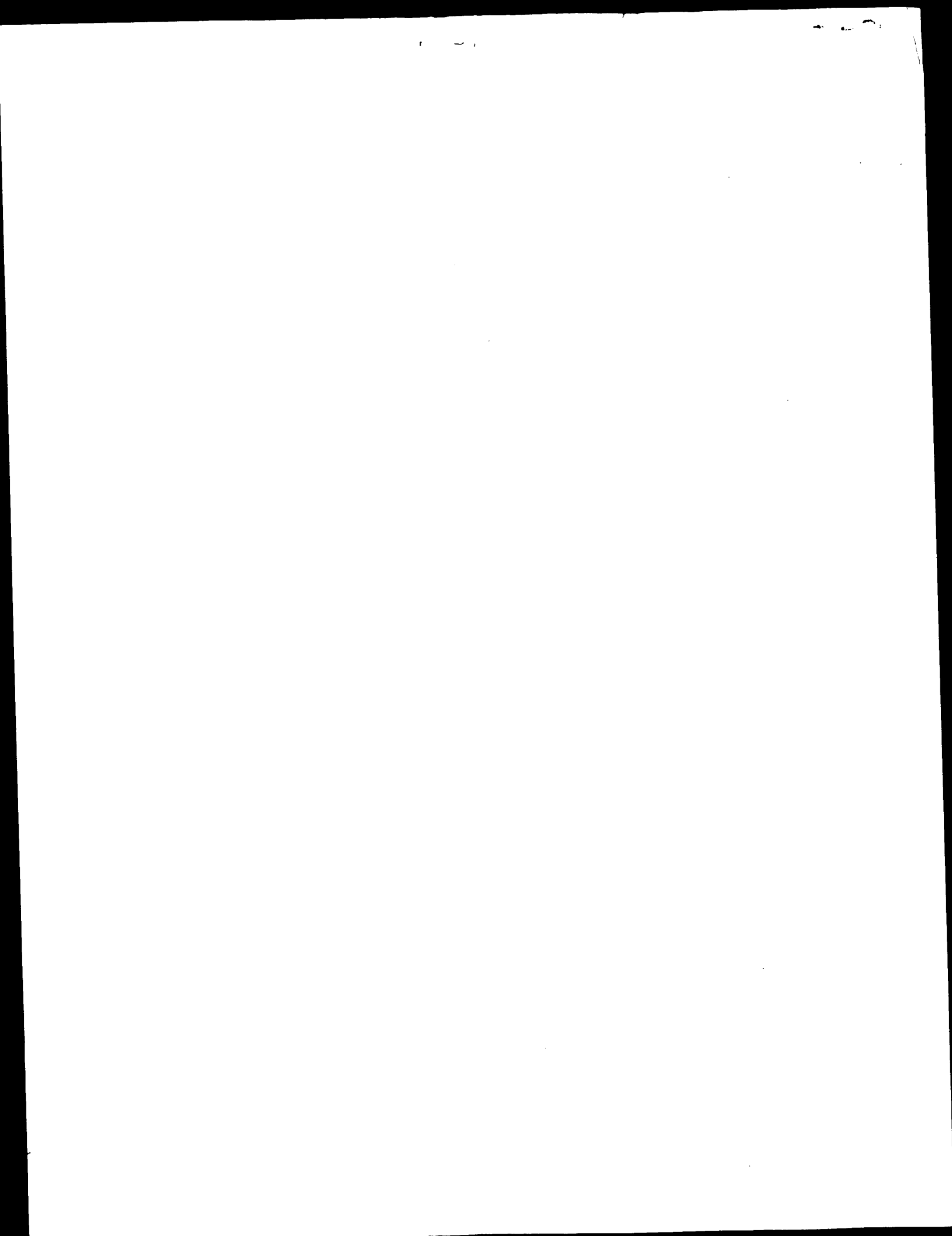
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03476

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet (1)

immunologically assaying virus-containing samples, these samples are treated with specific reagents such as surfactants or these reagents are present together with the samples in the assay step, while the technical features of group II reside in the hybridoma and the monoclonal antibody per se obtained from this hybridoma. Such being the case, it does not appear that there is a technical relationship between these groups of inventions involving one or more of the same or corresponding technical features.



明 細 書

ウイルスの検出又は測定方法

技術分野

本発明はウイルスの検出又は測定方法及びそのための試薬に関する。

背景技術

現在、種々のウイルス検出法は、血液や血液製剤中の感染性ウイルスの存在のスクリーニングや、疾患患者中のウイルスの有無の判定などに用いられている。しかしながら、それらの方法は、各種ウイルスによっても若干異なるが、必ずしも高感度、高特異性を有している場合だけではなく、たとえそうであっても、高コストであったり、ウイルス分離培養のように長時間を必要としたりするものが多い。以下、主にC型肝炎に関して述べ、本発明の背景技術とする。

C型肝炎は、長い間その原因因子が明らかではなかったが、その遺伝子がクローニングされ（*Science* 244:359-362, 1989）、その遺伝子を基に作られたリコンビナント抗原を用いた抗体測定による診断法が開発されたことにより（*Science* 244:362-364, 1989）；特表平2-500880号公報）、HCV（C型肝炎ウイルス、*Hepatitis C Virus*）を原因因子とする、血液及び血液関連製剤を主たる感染経路とする感染症であることが明らかとなった。組換えコア抗原、組換えNS3抗原を加えたいわゆる第2世代抗体検査法の開発により、HCV感染者のほとんどを血清検査により判別する事

が可能となった。このことにより国内献血による感染をほとんど絶つことが可能となった。

しかしH I V（ヒト免疫不全症ウイルス）などの一般的なウイルス感染症同様に、感染初期の抗体が生じて来るまでの期間、いわゆるウィンドピリオドと呼ばれる判別不能期間が存在し、売血が認められている地域などや国内の一部でも抗体検査では判別できなかった血液由来の成分により、依然として二次感染が起こるリスクが存在している。また抗体検査は、その原理から感染後治癒した既往者か、活動性の感染者か否かを判別することが出来ないことが問題である。

また現在C型肝炎の治療にはインターフェロン（I F N）が用いられているが、I F NによりH C Vが駆除されて6ヶ月後にはH C V抗体価が低下することからH C V抗体価を測定することのみにて治療効果を判別することが可能であるとする研究者もいる。しかし抗体価の動きは抗原刺激低下後、すなわち抗原駆除後数カ月間以降でないと低下しないことから、抗体検査を行なうのみではI F N投与によりH C Vが駆除されたか否かを適時に的確に判別することが出来ない。すなわち治療のモニタリングを行なうためには、H C Vに対する抗体ではなく、H C Vそのものを検出する方法が必要である。

H C Vは他のウイルスたとえばH B V（B型肝炎ウイルス）などに比して血中ウイルス量が低い事、および生体外（i n v i t r o）で、または動物などを宿主としてウイルスを増殖させることが出来ないため、ウイルス粒子（ウイルス抗原）を直接検出する方法を確立することが困難であった。そのためウイルス抗原を検出する代わりにP C R（ポリメラーゼチェーンリアクション）法（S c i e n c e 230:1350-1354, 1985）や分岐鎖D N

Aプローブ法により、ウイルスゲノムRNAを検出する方法が開発された。しかしウイルスゲノムを検出する方法は、ウイルス抗原を検出する方法と比較していくつかの問題点がある。

まず検出する物質がRNAであるため保存安定性が低いため、血清の凍結融解操作により定量値が低下するなどの問題が指摘されている。そのため従来の血清検査法よりも検体の保存に留意する必要がある。また検体の輸送の際にも細心の注意をはらう必要が有る。

例えばPCR法を用いた検査法は、遺伝子断片を検出するには最も高感度な検出方法であるが、検体中からHCVゲノムRNAを抽出する際、またゲノムRNAから鋳型DNAへの逆転写の際にロスを生じやすく安定した定量値を得るためには熟練を要すること、また増幅を行うことが重要な原理であるために、コンタミネーションを起こした際、高頻度に偽陽性を生ずるなどの問題があり、一度に大量の検体を処理することができない。また簡便とされる方法を用いても前処理時間が2時間以上も必要であり、多数回の遠心操作を含むなど煩雑である。加えて、このように操作が繁雑であるために、コンタミネーションの機会が増え、偽陽性検体の生じる可能性を増加させている。一方分岐鎖DNAプローブ法は検出感度が低く、結果が得られるまで約20時間を要し（医学と薬学 31:961-970, 1994）、感度、操作時間という点で課題が残されている。

上記のウイルスゲノムを検出する方法の問題点を解決するために、ウイルス抗原を直接検出する方法も開発された。特開平8-29427に示されているように、HCVのコア抗原に対して特異性を有するモノクローナル抗体を用いて、血清中のコア抗原を検出する方法が開発された。本報は田中等（Journal of Hepa

t o l o g y 23 : 742 - 745, 1995) および藤野等 (医学と薬学 36 : 1065 - 1070, 1996) に報告されているように血清中に存在するコア抗原を検出することにより、上記のウイルスゲノムを検出する方法同様に臨床的有用性を持つことが示されている。しかしながらウイルスゲノム検出法と同様にいくつかの点で大きな問題が残されている。

一点はPCR法と比較して感度が低いため、血清スクリーニングの最終検査に用いることが出来ないことである。田中等 (J o u n a l o f H e p a t o l o g y 23 : 742 - 745, 1995) は、HCV RNA量として、 $10^4 \sim 10^5$ コピー/ml間が検出限界であることを示しており、藤野等 (医学と薬学 36 : 1065 - 1070, 1996) は、最も感度が高い検出方法であるCRT (コニペティテブリバーストランスクリプション) - PCR法でRNA陽性に分類されるC型慢性肝炎患者102例の治療前血清において、67%の陽性率であることを報告している。すなわち、感度の高いCRT - PCR法と比較した場合に感度の面で大きく劣っている。

さらに測定のための検体処理の工程が繁雑であり、かつ時間がかかることがスクリーニングなどの用途に用いようとした際に問題となる。すなわち検体 (血清) の処理のために、ウイルス粒子の濃縮と血清成分の除去のためのポリエチレングリコール (PEG) 処理 (4℃ 1時間)、遠心操作 (15分間)、上清の除去、尿素処理、アルカリ処理 (37℃ 30分間)、中和剤添加といった多段階処理工程を必要とする。また強固に形成され、PEGにより粘性を増した沈殿の尿素処理による分散工程は、非常に熟練を要する作業である。そのため、再現性を得るためには熟練度が必要であり、また最低約2時間の処理時間が必要である。さらに遠心操作、上清除去等

の工程があるために、自動化が困難で、かつ同時大量処理を困難にしており操作面においてもスクリーニングなどの大量処理を必要とする用途に適していない。

一方ウイルス抗原検出系は、以下の点で高感度PCR法と比較して優れている点がある。すなわち検出過程で過度の増幅処理操作が加わらないため、コンタミネーションに対し、非常に寛容である。またRNAのように不安定な物質を検出するのではなく、比較的安定な物質である抗原蛋白質を検出することから、検体の保存に過度の注意をはらう必要がなく、PCR検体に求められる超低温槽のような特別な機器を用いる必要もなく、また検体の輸送も容易になる。

これらの特長は、例えば血液事業や健康診断の様に、多数の検体を測定する用途に適した要件である。しかしながら、既に指摘したように、開示されているコア抗原検出法は、前処理が煩雑で自動化に適していない、感度が低く例えば血液事業などの感度が求められる用途におけるゴールドスタンダードになり得ないなどの理由により、多数の検体を扱ういわゆるスクリーニング用途に用いることが出来ず、PCR法に対して優れている点を活かすことが出来ていない。また、臨床的に有用性が高い測定方法は、常に感度、特異性、再現性、操作性、低コストを課題とし、これらを全て満たすように鋭意開発していく必要がある。HCV以外のウイルス抗原の検出に関しても、特に多数の検体を測定するスクリーニング用途においては、PCR法と比較して低感度であったり、また有用な前処理法やその抗原の露出がされないといった理由のために実用化されていないものが多い。

発明の開示

本発明の目的は、血液事業や健康診断のような、いわゆるスクリーニング用途の如き多数の検体を処理するのに適したH C V抗原検出法を含めた各種ウイルス抗原検出法を提供することである。すなわちP C R法と比較し同等の感度、特異度を持ち、前処理を簡便化すること、あるいは前処理操作をせずに容易に自動化などの大量処理システムに適用可能なH C V抗原を含めた各種ウイルス抗原検出系を提供することである。以下主にH C Vに関して本発明の態様を説明する。

本発明の第一の態様（その1）によれば、ウイルス粒子を破壊して、ウイルス抗原を十分に露出し、ウイルス抗原に対する抗体が存在する場合には該抗体を破壊して、ウイルス抗原を検出又は測定することによりH C Vを検出又は測定する手段を提供する。

従って、本発明は、（1）ウイルスを含む検体を、（1）陰イオン性界面活性剤及び、（2）両イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤又は蛋白質変性剤のいずれかを含む処理液で処理することを特徴とするウイルス含有検体の処理方法を提供する。

本発明はまた、（2）ウイルスを含む検体を、（1）陰イオン性界面活性剤、（2）両イオン性界面活性剤、及び（3）非イオン性界面活性剤又は蛋白質変性剤のいずれかを含んだ処理液で処理することを特徴とするウイルス含有検体の処理方法を提供する。

本発明はまた、（3）ウイルスを含む検体を、（1）陰イオン性界面活性剤、（2）両イオン性界面活性剤、（3）非イオン性界面活性剤、及び（4）蛋白質変性剤を含んだ処理液で処理することを特徴とするウイルス含有検体の処理方法を提供する。

本発明はさらに（4）前記（1）～（3）のいずれかに記載の検体処理方法を用いて、ウイルス抗原を特異的に認識するプローブを反応させることにより、ウイルス抗原の存在を検出又は定量するこ

とを特徴とするウイルスの測定方法を提供する。

本発明はさらに、前記（4）の免疫測定方法に用いるための、陰イオン性界面活性剤を含んで成る、検体中のウイルスの有無を判別するキット、定量するキット又は診断薬を提供する。

本発明はさらに、前記（4）の免疫測定方法に用いるための、後記のモノクローナル抗体を含んで成る、検体中のウイルスの有無を判別するキット、定量するキット又は診断薬を提供する。

本発明の第一の態様（その2）によれば、ウイルス粒子を破壊して、ウイルス抗原を十分に露出し、ウイルス抗原に対する抗体が存在する場合には該抗体を破壊して、ウイルス抗原を検出又は測定することによりウイルスを検出又は測定する手段を提供する。

従って本発明は、（5）ウイルスを含む検体を、（1）カオトロピックイオン、及び（2）酸性化剤を含む処理液で処理することを特徴とするウイルス含有検体の処理方法を提供する。

本発明はさらに、（6）ウイルスを含む検体を、（1）カオトロピックイオン、（2）酸性化剤、及び（3）非イオン性界面活性剤を含む処理液で処理することを特徴とするウイルス含有検体の処理方法を提供する。

本発明はさらに、（7）上記（5）及び（6）の検体処理方法を用いて、ウイルス抗原を特異的に認識するプローブを反応させることにより、ウイルス抗原の存在を検出又は定量することを特徴とするウイルスの測定方法を提供する。

本発明はさらに、上記（7）の方法に使用するためのカオトロピック剤を含んで成る、検体中のウイルスの有無を判別するキット、定量するキット又は診断薬を提供する。

本発明はさらに、上記（7）の内、HCVの免疫測定方法に用いるための、ハイブリドーマHC11-14（FERM BP-60

06), HC11-10 (FERM BP-6004) または HC11-11 (FERM BP-6005) により生産されるモノクローナル抗体を含んでなる、検体中の HCV の有無を判別するキット、定量するキット又は診断薬を提供する。

本発明の第二の態様によれば、ウイルスに対する抗体がまだ生成していないウインドピリオドにおけるウイルス抗原の検出又は測定方法を提供する。この方法においては、ウイルス粒子を破壊してウイルス抗原を露出せしめるだけで十分であり、ウイルス抗原に対する血中の抗体を破壊する必要がない。

従って本発明はさらに、ウイルスの測定方法において、炭素数 10 個以上のアルキル基と第 2、第 3 または第 4 級アミンとを有する界面活性剤もしくは 12~14 の新水疎水比 (HLB) を有する非イオン界面活性剤、又はこの両者の存在下で、ウイルス抗原をそのプローブとの結合により測定することを特徴とする方法を提供する。

本発明はさらに、上記のウイルス抗原の内、HCV コア抗原の検出のためのプローブとして適するモノクローナル抗体を生産する HC11-11 (FERM BP-6005), HC11-14 (FERM BP-6006), HC11-10 (FERM BP-6004), HC11-3 (FERM BP-6002)、及び HC11-7 (FERM BP-6003) から成る群から選択されるハイブリドーマ細胞株を提供する。

本発明はまた、HC11-11 (FERM BP-6005), HC11-14 (FERM BP-6006), HC11-10 (FERM BP-6004), HC11-3 (FERM BP-6002), HC11-7 (FERM BP-6003) から成る群から選択されるハイブリドーマによって産生されるモノクローナル

抗体を提供する。

さらに、RNAウイルスであるHCVや、DNAウイルスであるHBVはともにこれらのゲノムRNAやDNAを包む構造蛋白質と、それを取り囲む膜蛋白質や脂質膜からなる構造をもつウイルス粒子を形成するウイルスである。いずれの態様においても、本発明の処理法を用いることにより、HCVやHBVだけでなく、これらと同じような構造をもつウイルス粒子を破壊して、ウイルスの抗原を十分に露出させ、その抗原を検出または測定することによりそのウイルスを検出または測定することをも提供する。

図面の簡単な説明

図1は、検体処理においてSDS添加濃度による効果を検討した結果を示す図である。健常人血清（normal）およびHCV-RNA陽性パネル血清13, 50を使用した。

図2は、検体処理においてCHAPS添加濃度による効果を検討した結果を示す図である。健常人血清（normal）およびHCV-RNA陽性パネル血清13, 50を使用した。

図3は、検体処理において尿素添加濃度による効果を検討した結果を示す図である。健常人血清（normal）およびHCV-RNA陽性パネル血清13, 44, 50を使用した。

図4は、検体処理におけるTriton X100添加温度による効果を検討した結果を示す図である。健常人血清（normal）およびHCV-RNA陽性パネル血清13, 44, 50を使用した。

図5は、検体処理中の温度による効果を検討した結果を示す図である。健常人血清（normal）およびHCV-RNA陽性パネル血清13, 44, 50を使用した。

図 6 は、標準血清のパネル血清を 50 を 1 U/ml として段階的に希釈し、検体処理した試料を本発明のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ反応系の希釈検量線と検出感度を示す図である。

図 7 は、標準血清のパネル血清 50 を 1 U/ml として段階的に希釈し、検体処理した試料をサンドイッチイムノアッセイ反応系で測定したときの希釈検量線と検出感度を示す図である。基質に発光物質を用いている。

図 8 は、パネル血清 13 を、検体処理をおこなってから、ゲルロカラムを用いて分画し、その分画中のコア抗原免疫活性を測定したものである。分子量は、IgG は約 150 kD、アルブミンは約 68 kD である。

図 9 は、PCR 陽性検体を、本発明の検体処理後その遊離したコア抗原活性を測定した値とアンプリコア HCV モニター (PCR 法) で求めた HCV-RNA 量との相関性を示す図である。

図 10 は、検体処理において塩酸グアニジン添加濃度による効果を検討した結果を示す図である。健常人血清 (normal) および HCV-RNA 陽性パネル血清 13, 50 を使用した。

図 11 は、検体処理において Triton X100 添加濃度による効果を検討した結果を示す図である。健常人血清 (normal) および HCV-RNA 陽性パネル血清 13, 50 を使用した。

図 12 は、検体処理において Tween 20 添加濃度による効果を検討した結果を示す図である。健常人血清 (normal) および HCV-RNA 陽性パネル血清 13, 50 を使用した。

図 13 は、検体処理中の温度による効果を検討した結果を示す図である。健常人血清 (normal) および HCV-RNA 陽性パネル血清 13, 50 を使用した。

図 14 は、標準血清のパネル血清 50 を 1 U/ml として段階的に

希釈し、検体処理した試料をサンドイッチイムノアッセイ反応系で測定したときの希釈検量線と検出感度を示す図である。

図 1 5 は、パネル血清 1 3 を、検体処理をおこなってから、ゲルロカラムを用いて分画し、その分画中のコア抗原活性を測定したものである。分子量は、I g G は約 1 5 0 k D、アルブミンは約 6 8 k D である。

図 1 6 は、アンプリコア H C V モニターキットで陽性を示した検体について、本発明の検体処理後その遊離したコア抗原活性を測定した値とアンプリコア H C V モニター（P C R 法）で求めた H C V - R N A 量との相関性を示す図である。

図 1 7 は、組換え B 型肝炎（H B V）コア抗原を本発明の方法により測定した場合の標準曲線を示す。

発明の実施の形態

本発明の対象となるウイルスは、ゲノム R N A 又は D N A を包む構造蛋白質と、それを取り囲む膜蛋白質又は脂質膜から構成される構造を有するウイルス粒子を形成するウイルスである。

ゲノムとして R N A を有する上記ウイルスの代表的例としては C 型肝炎ウイルス（H C V）、及び H C V 類縁ウイルスが挙げられる。

H C V 類縁ウイルスとしては、D 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルス、G 型肝炎ウイルス、手足口病ウイルス、フラビウイルス（黄熱ウイルス、西ナイルウイルス、日本脳炎ウイルス、デングウイルス）、トガウイルス（アルファウイルス、ルビウイルス、アルテリウイルス、ルベラウイルス）、ペスチウイルス（ブタコレラウイルス、ウシ下痢ウイルス）、パラミクソウイルス（パラインフルエンザウイルス 1, 2, 3, 4、イヌジステンパーウイルス、ニューカ

ッスル病ウイルス、RSウイルス、リンダペストウイルス、サルパラインフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス)、オルソクソウイルス(ヒトインフルエンザウイルス、トリインフルエンザウイルス、ウマインフルエンザウイルス、ブタインフルエンザウイルス)、ラブドウイルス(狂犬病ウイルス、水泡性口内炎ウイルス)、ピコルナウイルス(ポリオウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルス、ウシエンテロウイルス、ブタエンテロウイルス、サルエンテロウイルス、マウス脳脊髄炎ウイルス、ヒトライノウイルス、ウシライノウイルス、ウマライノウイルス、口蹄疫ウイルス、A型肝炎ウイルス)、コロナウイルス(ヒトコロナウイルス、ニワトリ伝染性気管支炎ウイルス、マウス肝炎ウイルス、豚伝染性胃腸炎ウイルス)、アレナウイルス(リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、ラサウイルス、韓国型出血熱ウイルス)、レトロウイルス(H T L V : ヒト成人白血病ウイルス、H I V : エイズウイルス、ネコ白血病肉腫ウイルス、牛白血病ウイルス、ラウス肉腫ウイルス)、レオウイルス(ロタウイルス)、カリシウイルス(ノーウオークウイルス)、ブンヤウイルス(腎症候性出血熱ウイルス)、フィロウイルス(エボラウイルス、マールブルグウイルス)などがあげられる。

また、ゲノムとしてDNAを有する上記ウイルスの代表例としてはB型肝炎ウイルス(H B V)、及びH B V類縁ウイルスが挙げられる。H B V類縁ウイルスとしては、ポックスウイルス(ワクシニアウイルス、アラストリウムウイルス、牛痘ウイルス、天然痘ウイルス)、パルボウイルス(ヒトパルボウイルス、豚パルボウイルス、牛パルボウイルス、犬パルボウイルス、ネコ白血球減少症ウイルス、ミンクアリューション病ウイルス)、パポーバウイルス(パピローマウイルス、ポリオーマウイルス)、アデノウイルス、ヘルペ

スウイルス（単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、EBウイルス、馬ヘルペスウイルス、ネコヘルペスウイルス、マレック病ウイルス）、アフリカ豚コレラウイルスなどがあげられる。

また、これらの他にも各種病原性のあるウイルスが知られているし、また未確認のウイルスもまだ存在しているが、それらのウイルス構造が前述のように、ゲノムRNA又はDNAを包む構造蛋白質と、それを取り囲む膜蛋白質や脂質膜から構成される構造をもつウイルス粒子を形成するウイルスであれば、本発明の処理方法により、免疫測定法に適した状態に遊離させることができることは明白である。

主にHCVを中心に実施形態を述べる。HCVは血中濃度が 10^2 コピー/ml $\sim 10^6$ コピー/mlと、HBV（ 10^9 コピー/ml）と比較し低いことから、ウイルス抗原を検出するためには極めて高い感度を必要とする。

一般に抗体をプローブとする免疫学的な手法に代表される検出方法に於て、検出感度を増加させる方法としては、I) 検出する抗原分子の分子数を上昇させる、II) 抗原に結合するプローブ、例えば抗体の分子数を上昇させる、III) 検出感度の下限を規定するプローブ、例えば抗体と抗原以外の物質との結合などに起因する非特異反応を減少させる、IV) 検出に用いる標識物の検出感度を増加させる方法が考えられ、これらの方法を組み合わせることにより感度を上昇させることが可能となる。

抗原分子数を増加させる方法としては、I-1) 検体の量を増加させる事が最も容易に考えられることであるが、一般的に用いられている反応系（例えば96wellイムノプレート）では最大添加可能な容量は300 μ l程度であり自ずと上限が規定されるので、

I - 2) 濃縮により反応系に加える分子数を増加させる方法が用いられる。

抗原に結合する検出のためのプローブ、例えば抗体の分子数を上昇させるためには、II-1) 複数のプローブ、例えば抗体を用いることにより認識エピトープの数を増加させる、II-2) プローブ、例えば抗体と抗原との親和性（アフィニティー及びアビディティー）を上昇させることにより、単位時間あたりに結合する抗体の数を増加させる事が容易に考えつく手法である。ここで抗原とプローブ、例えば抗体の親和性を向上させる方法としては、反応系の緩衝液の組成を変化させる方法、プローブを改変する方法、これらの組み合わせが考えられる。II-3) ビーズや磁性粒子などの表面積の広い担体に多量に抗体を結合させることによって、限られた量の抗原との反応面積を広くすることにより、多くの抗原を捕獲することも考えられる。

また感染症の場合は検体中に抗原と結合する高い親和性を示すヒト抗体が存在することが予想され、これらの抗体のエピトープが検出に用いるプローブ、例えば抗体のエピトープと重なることにより競合反応が起こり検出に用いる抗体数の減少につながる事が予想されるため、この検体中の反応を阻害する抗体を除く事により抗原に結合する検出のための抗体の分子数を増加させる事につながる（II-3）。

非特異反応を減少させる方法を一般化することは困難であるが、III-1) 緩衝液組成を変化させることによりプローブ、例えば抗体の抗原との親和性（アフィニティー及びアビディティー）を上昇させることにより非特異反応を軽減させる、III-2) 非特異反応の原因物質を除去するなどの方策が考えられる。

標識物の検出感度を上昇させる方法としては、IV-1) 検出感度

の高い標識物（放射性同位元素など）を用いる、IV-2）酵素や触媒を標識物に用いることにより信号を増幅させる、IV-3）酵素基質をより感度の高い基質に改変する、IV-4）酵素反応、化学反応の基質のシグナルを化学的、または電氣的、機械的に増幅させる、IV-5）抗体当たりの標識物の数を増加させる、IV-6）シグナルの検出に用いる機器の感度を上昇させるなどの方法が考えられる。

開示されているHCVコア抗原検出法の前処理法の工程を解析すると、検体にポリエチレングリコールを加えた後に遠心操作によりHCVを沈殿として回収することにより抗原を濃縮する（I-2）ことと同時に血清成分の一部を除去する（II-2）工程を行った後、尿素とアルカリ剤を含む溶液に再懸濁することにより検体中に存在するヒト抗体を不活化し（II-3）HCVからコア抗原を遊離させる工程、非イオン性界面活性剤（T r i t o n - X 1 0 0）と中和剤を含む溶液を加えることによりモノクローナル抗体と反応させる溶液にする工程から成り立っている。

既に上記に指摘したように遠心操作、沈殿の再懸濁操作が操作上煩雑な過程であり、熟練度を必要とする過程である。従って本発明の達成目標は、これらの操作上の問題点を解決したコア抗原検出系である。

HCVそれ自体はいまだその姿が明らかとなっていないが、そのゲノム構造、類縁のウイルス粒子の構造、一般的なウイルスに関する情報から、HCV粒子はゲノムRNAがコア抗原によりパッキングされ、それを取り囲むように脂質膜にアンカリングしているE1、E2／NS1抗原からなる外被蛋白質によって囲まれた状態で存在するものと推定される。

そのためコア抗原を検出するためには外被を取り除き、コア抗原の検出に用いるプローブ、例えば抗体が結合できるようにする必要

がある。またウイルス粒子は血中ではLDL（低密度リポ蛋白質）などに囲まれた複合構造を取っていることが報告されており、さらに外被蛋白質に対する抗体も存在することから、ウイルス粒子と抗外被蛋白質抗体との免疫複合体としても存在することが予想される。すなわち検出する抗原の分子数を増加させるためには、ウイルス粒子から効率よく外被やウイルス粒子を取り囲む夾雑物を取り除き、かつコア抗原分子を効率よく遊離させることが重要である。

HCV以外のウイルスに関してもほぼ同じことが言え、ウイルスの構造タンパク質を効率よく遊離させなくてはならない。

従って、本発明は、検体（血清）中のウイルス抗原を、遠心分離のような煩雑な操作によって濃縮することなく、プローブを用いた検出に適した状態にさせる処理方法に関する。

さらに上記のように検体中には検出に用いるプローブ、例えば抗体と結合を競合するヒト抗体が高力価で存在するため、これを取り除く操作が、感度上昇のために重要である。

従って本発明の1つの態様においては、検体中のウイルス抗原を簡易に遊離させる処理方法を用い、検体中に存在するヒト抗体をも同時に不活化させる処理方法に関する。

本発明によって示される処理方法を用いることにより、検体中に存在するウイルス抗原は、プローブ、例えば抗体との免疫複合体を形成するのに適した状態でウイルス粒子または免疫複合体から遊離し、同時に検出反応を阻害する検体中に存在するヒト抗体をも同時に不活化させることにより、例えば抗体のようなプローブを用いた免疫測定法によって容易にかつ感度高く検出することが可能となる。

本発明の第一の態様（その1）によれば、検出に用いるプローブ、例えば抗体はウイルス抗原に特異的に結合するものであり、一定

の高い親和性を示し、反応系に加えた際に非特異反応などを誘発しないようなものであればよい。例えば、H C V コア抗原の検出においては、実施例 4 に示す様に、一次反応に用いるプローブの一つは H C V コア抗原の C 端側を認識し結合できるものが含まれていることが好ましい。ここでコア抗原の C 端側とは、配列番号 2 に示す配列の 81 番目から 160 番目の配列、もしくはその一部をいう。さらにここにコア抗原の N 端側に対するプローブが含まれていても良い。ここでコア抗原の N 端側とは、配列番号 2 に示す配列 10 番目から 70 番目の配列、もしくはその一部をいう。

また、本発明の第一の態様（その 2）によれば、検出に用いるプローブ、例えば抗体はウイルス抗原に特異的に結合するもので有り、一定の高い親和性を示し、反応系に加えた際に非特異反応などを誘発しないようなものであればよい。例えば、H C V コア抗原の検出においては、一次反応に用いるプローブの一つは H C V コア抗原の N 端側を認識し結合できるものが含まれていることが好ましい。ここでコア抗原の N 端側とは、配列番号 2 に示す配列の 10 番目から 70 番目の配列、もしくはその一部をいう。さらにここにコア抗原の C 端側に対するプローブが含まれていても良い。ここでコア抗原の C 端側とは、配列番号 2 に示す配列 81 番目から 160 番目の配列、もしくはその一部をいう。

いずれの態様においても、プローブとしては、マウス、ウサギ、ニワトリ、ヤギ、ヒツジ、ウシなどの実験動物を免疫して得られるポリクローナル抗体、免疫した個体から、脾臓細胞を分離し、ミエローマ細胞と融合させることによって得られるハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体、または脾臓細胞、血中白血球を E B ウイルスによって不死化させた細胞の産生するモノクローナル抗体、H C V に感染しているヒトもしくはチンパンジーなどが産生してい

る抗体；マウス、ヒトなどのイムノグロブリンの cDNA もしくは染色体 DNA から得られる可変領域遺伝子断片、またはイムノグロブリンの cDNA もしくは染色体 DNA の一部と人工的に作製した配列とを組み合わせることによって構成される可変領域遺伝子断片、人工的な遺伝子配列を用いて構成される可変領域遺伝子断片またはこれらを材料に遺伝子組換え手法によって作製される可変領域遺伝子断片を、イムノグロブリン定常領域遺伝子断片を組み合わせることによって構成される組換え抗体遺伝子によって形質転換された細胞が産生する組換え抗体；上記の可変領域遺伝子断片と例えばバクテリオファージの構造蛋白質と融合させて作られるファージ抗体、上記の可変領域遺伝子断片を他の適用な遺伝子断片例えば myc 遺伝子の一部などと組み合わせることにより構成される組換え抗体遺伝子によって形質転換された細胞が産生する組換え抗体、トリプシン分子に可変領域を人工的に導入することによって産生されるプローブ、レセプターなどの蛋白質に特異的に結合する分子を人工的に改変することによって得られるプローブ、その他コンビナトリアルケミストリー技術によって作製されたプローブなど、コア抗原に高い特異性、親和性を示す分子であればそれを用いることが出来る。

さらに本発明はウイルス抗原を含む検体から、上記のウイルス抗原とそのプローブ、例えば抗体との免疫複合体を形成するのに適した状態にするため、ウイルス粒子または免疫複合体から遊離し、同時に検出反応を阻害する検体中に存在するヒト抗体をも同時に不活化させる処理剤によって検体を処理する工程、遊離したコア抗原を例えば抗体のようなプローブを用いた免疫測定法によって検出並びに定量するアッセイ方法、並びに検査キットを提供する。

本発明によって示される検体処理剤と処理方法

本発明における検体には、全血、血漿、血清、尿、唾液、脳脊髄液などの生物学的体液、および肝組織などが含まれる。

本発明においては、検体を煩雑な操作なく、プローブ例えばモノクローナル抗体と結合反応させるのに適した状態に検体中のコア抗原などのウイルス抗原を処理する方法が最も重要な要件である。すなわち、抗原分子数を増加させるために、ウイルス粒子中などに含まれるコア抗原などのウイルス抗原を効率よく遊離させることが重要になる。

既にSDS（ドデシル硫酸ナトリウム）ポリアクリルアミド電気泳動法（SDS-PAGE）によっても知られているように、ほとんどの蛋白質はSDS存在下の熱処理により変性し、共有結合によって結合している分子以外はモノマーになる。すなわち、測定検体にSDS等の陰イオン性界面活性剤を含む処理剤を添加すると、ウイルスを破壊すると同時に検体中の抗コア抗体などのウイルス抗原に対する抗体をも変性させ、検体中のコア抗原などのウイルス抗原を遊離させることが可能である。このことは、HCVコア抗原を例に挙げると、実施例7に示す様に、SDSを含む処理剤で処理したHCV感染検体中のコア抗原を、ゲル濾過を用いた分子量解析にかけると、理論上から予想される単量体の位置に検出されることから確認された。

また柏熊等（J. Immunological Methods 190 79-89, 1996）によって報告されているように、組換えHCV発現細胞抽出液からなる検体を、SDS-PAGEにより分離し、ウェスタンブロット法によりコア抗原を検出すると、単量体と思われる分子量の位置にその免疫活性が検出される。SDSを含む変性剤を検体に加えることにより、抗原を効率よく遊離させ抗原分子数を増加させることができることはこの分野に属する

ものであれば容易に考え得る。

しかしながらよく知られているように S D S 等の陰イオン性界面活性剤は蛋白質変性作用が大きいため、その存在下でそのままプローブ、例えば抗体との免疫複合体形成反応に加えると、抗体をも変性させ、その機能を失わせ感度低下を導く。また、S D S 等の陰イオン性界面活性剤処理によってエピトープ構造が失われることが知られており、その結果として抗体の結合が弱められ、感度が低下する。これらの感度低下につながる影響を除くため、S D S 処理後何らかの方法で変性作用を弱める必要が有る。

陰イオン界面活性剤を含む界面活性剤は、例えば透析、限外濾過、ゲル濾過法、電気泳動法、イオン交換法、沈殿法、膜転写法などにより除くことが出来ることが知られており、上記のようにウェスタンブロット法、ゲル濾過法により抗原が検出可能であることは、S D S 処理後、なんらかの操作を加えることにより抗原抗体反応を行なわせることが可能であることを示している。しかしながら、これらの処理を行なうことは、何れも時間と煩雑な操作を必要とするため本発明の目的に適した方法ではない。

また過剰量の反応液によって希釈することにより、変性作用を示さない濃度まで低下させることにより反応に影響を与えない様になるが、この方法では反応液が増加し、例えばマイクロタイターウェルを用いる測定方法などの加えるサンプル量に制約が有る免疫測定法に適用できないため、本発明の目的に適していないことは明らかである。

そこで本発明者は、本発明の第一の態様（その 1）において、陰イオン性界面活性剤を含む処理剤を添加し、さらに何らかの添加剤を加えることにより、陰イオン性界面活性剤による変性効果を、抗体などのプローブに影響を与えないように弱めることが出来ないか

、また同時に陰イオン性界面活性剤によるコア抗原遊離作用を増強することができないかを検討した。

ここで本発明者は、S D S等の陰イオン性界面活性剤以外の界面活性剤を含む処理剤を添加することにより、S D Sの固相化抗体に対する変性作用を弱め、その結果S D Sを含む処理剤のみと比較して、感度を上昇させることが出来ることを見いだした。また、S D S等の陰イオン性界面活性剤を含む処理剤に、それ以外の界面活性剤や尿素などの水素イオン結合を弱める薬剤を同時に加えた処理剤とした場合にも、同様の効果を認めるとともに、ウイルス粒子からのコア抗原遊離および検体中抗コア抗原抗体の不活化を強くすることによって、コア抗原の遊離がさらに増強されることを見いだした。さらにS D Sとその他の界面活性剤を含む処理剤を添加した後熱処理工程を行なうことにより、より高感度にコア抗原を検出できることを見だし、本発明を完成させるに至った。

ここで、検体の処理に用いる陰イオン性界面活性剤はS D S以外でも、セチル硫酸ナトリウムや他のアルキル化硫酸エステル、ドデシルスルホン酸ナトリウムのようなアルキル化スルホン酸塩、アルキルアリルスルホン酸塩などでも可能であり、陰イオン性界面活性剤以外に加える界面活性剤としては、C H A P S (3-[3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸)、C H A P S O (3-[コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホン酸)、ドデシル-N-ベタイン、3-(ドデシルジメチルアンモニオ)-1-プロパンスルホン酸などの両イオン性界面活性剤やT r i t o n X 1 0 0などのポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル類、N P 4 0などのポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル類、T w e e n 8 0などのポリオキシエチレンソルビトールエステル類、B r i j 5

8のようなポリオキシエチレンドデシルエーテル類、オクチルグルコシドといった非イオン性界面活性剤が適当で有り、好ましくはCHAPSなどの両イオン性界面活性剤とTriton-X100などの非イオン性界面活性剤を含む。また、ここに尿素、チオ尿素などの蛋白質の高次構造を壊す様な作用を示す薬剤（蛋白質変性剤）を加えることも効果的である。

処理の際の濃度は、SDSは0.5%以上、CHAPSは、0.1%以上、尿素は1M以上、TritonX100は0.1%以上0.75%以下で使用する事がより好ましい。

以上のような検体の処理温度は、通常一般実験室で用いられている範囲である4℃以上100℃以下であればよいが、非イオン性界面活性剤添加の場合は、その曇点に注意が必要である。好ましくは、37℃以上であり、さらに血清の非働化に一般的に用いられている50～60℃処理が効果的である。

ヘモグロビンによる妨害の除去

測定用試料として血清等を使用する場合、該試料に含まれる赤血球が、前記の前処理の間に溶血してヘモグロビンが放出され、この変性ヘモグロビンがHCVコアのようなウイルス抗原に結合して測定を妨害する場合がある。従って本発明の第一の態様においては、ヘモグロビン中のヘムを捕捉して測定の妨害を除去することが好ましい。このための添加剤として、尿素、イミダゾール環含有化合物及びインドール環含有化合物の内少なくとも1種を添加するのが好ましいことを見出した。

イミダゾール環含有化合物としてはイミダゾール、ヒスチジン、イミダゾールアクリル酸、イミダゾールカルボキシアルデヒド、イミダゾールカルボキサミド、イミダゾールジオン、イミダゾールジチオカルボン酸、イミダゾールジカルボン酸、イミダゾールメタノ

ール、イミダゾリジンチオン、イミダゾリドン、ヒスタミン、イミダゾピリジン等が挙げられる。

また、インドール環含有化合物としては、トリプトファン、インドールアクリル酸、インドール、インドール酢酸、インドール酢酸ヒドラジド、インドール酢酸メチルエステル、インドール酪酸、インドールアセトニトリル、インドールカルビノール、インドールカルボキシアルデヒド、インドールカルボン酸、インドールエタノール、インドール乳酸、インドールメタノール、インドールプロピオン酸、インドールピルビン酸、インドリルメチルケトン、インドーマイシン、インドールアセトン、インドメタシン、インドプロフェン、インドラミン等が挙げられる。

添加量としては尿素は 0.5 M ~ 5 M の濃度が適当であり、インドールアクリル酸は 5 mM ~ 50 mM の濃度が適当であり、その他の添加物は 0.05 M ~ 0.5 M の濃度が適当である。

他方、HCV の外被蛋白質などの膜タンパク質などは、何らかの処理をしない限り水に溶けることはない。このような疎水性部分をその一部に持つ蛋白質を水に溶かすには、界面活性剤を用い、疎水性部分を親水性に変換させることによる方法がよく知られているが、グアニジン塩酸などのある種の塩はこのような難溶性の蛋白質を水に溶けやすくさせる性質を持っていることが知られている。このような性質を示す塩（カオトロピック剤）から生じるイオンはカオトロピックイオンと呼ばれており、陰イオンとしてはグアニジンイオン、チオシアン酸イオン、ヨウ素イオン、過ヨウ素酸イオン、可塩素酸イオンなどが知られており、これらのイオンを生ずる塩が難溶性蛋白質の可溶化に用いられている。カオトロピックイオンは、ウィルス粒子から抗原が効率よく遊離させる機能を持つことが予測された。

しかしながら、このようなカオトロピックイオンを加えると蛋白質の2次構造が部分的に破壊されるため、その結果としてエピトープ構造が失われる。そのためカオトロピックイオン存在下でそのままプローブ、例えば抗体との免疫複合体形成反応に加えると、抗体の結合が弱められ、感度が低下するので、大きな問題点となると考えられる。

その一方でカオトロピックイオンの変性作用は可逆的である場合が多く、透析や希釈によりイオン強度を弱めることにより一時的に変性した構造が元に戻る場合がある。このことは、グアニジンなどのカオトロピックイオンによる処理剤を用いた場合のもう一つの問題点を示している。つまり本発明の目標とする処理方法には、検体中に存在するウィルス粒子などに含まれる抗原を効率よく遊離させることのみならず、同時に検体中に存在する抗原に結合する高力価抗体をも失活させる必要がある。すなわち、カオトロピックイオンによる可溶化では、検体中に存在する高力価抗体の失活が不十分で、この抗体の影響により感度が低くなることが考えられる。

そのためカオトロピックイオンを用いた処理方法は2つの相反する課題を内包している。つまりカオトロピックイオンにより構造を壊すような条件では抗原抗体反応が阻害される、その一方でカオトロピックイオンの効果のみでは検体中の反応を阻害する抗体の不活性化が不十分であり、抗原抗体反応を阻害しない様な状況にした場合、夾雑抗体により反応が阻害される。

すなわちこの相反する課題を解決するためには、抗原のエピトープ構造は可逆的に破壊され、検体中の夾雑抗体の機能破壊が不可逆的に起こるような条件を見いだす必要がある。

抗体の活性を失活させる条件は、アルカリ処理、酸処理などが知られている。血清を酸処理すると、一部の血清蛋白質は非可逆的に

変性し沈殿を生じるため、検体処理後の例えばピペッティング操作の障害になることが多く、また測定の際に固相に変性蛋白質を巻き込んだ沈殿が吸着し、濁度として検出されることもあり、擬陽性の原因ともなりえる。加えて、それらの沈殿物の中に、非特異的に目的とする抗原が巻き込まれ、プローブとの反応量の減少による感度低下につながるなどの問題点も生じる。

本発明者は、酸処理とグアニジン処理を組み合わせることにより、沈殿物の形成などの酸処理の問題点、グアニジン処理の相反する問題点が解消されることを見だし本発明を完成させるに至った。また、グアニジンなどのカオトロピックイオンを生じる処理剤と酸性化剤からなる処理剤に、界面活性剤を加えると、さらに好ましいことも見いだした。酸性化剤としては、塩酸、硫酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、トリクロル酢酸などが、適当である。

また、界面活性剤としては、CHAPS（3-〔3-コラミドプロピル〕ジメチルアンモニオ〕-1-プロパンスルホン酸）、CHAPS O（3-〔コラミドプロピル〕ジメチルアンモニオ〕-2-ヒドロキシー-1-プロパンスルホン酸）、ドデシル-N-ベタイン、3-（ドデシルジメチルアンモニオ）-1-プロパンスルホン酸などの両イオン性界面活性剤や、Triton X 100などのポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル類、NP 40などのポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル類、Tween 20などのポリオキシエチレンソルビトールエステル類、Brij 58のようなポリオキシエチレンドデシルエーテル類、オクチルグルコシドといった非イオン性界面活性剤が適当である。さらにここに尿素などの水素イオン結合を弱めることにより蛋白質の高次構造を部分的に壊す様な作用を示す薬剤を加えてもよい。

特に、塩酸グアニジン濃度は2 M以上で、Triton X 100

濃度は2%以上で、Tween 20濃度は0.02%以上で、4℃から45℃の範囲で使用する事がより好ましい。

いずれの態様においても、本発明の処理方法を用いることにより、HCVやHBVと同様の構造を持つウイルス粒子を含む検体から、ウイルス抗原を、抗体などをプローブとして用いるいわゆる免疫測定方法に適した状態に遊離させることが出来ることは明らかである。ここでHCVやHBVと同様の構造を持つウイルスとは、ゲノムRNA又はDNAをパッキングする蛋白質と、それを取り囲む膜タンパク質や脂質膜から構成される構造を持つウイルス粒子を形成するウイルスであり、例えばHCVの類縁のウイルスであるフラビウイルス類、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)などのレトロウイルスなどが含まれる。さらにHBVと同じようにゲノムとしてDNAを持つものであっても同様の構造を持つものが含まれる。

ウイルス抗原の露出

本発明の第二の態様によれば、ウインドピリオドにおいて採取した試料中のウイルス抗原を検出方法に関し、この方法においてはウイルス抗原に対する抗体はまだ生成していないので、ウイルス粒子を破壊してウイルス抗原を露出させるだけで十分であり、試料中に存在する抗体を破壊する必要はない。従って、前に説明した試料の前処理は必要でなく、測定反応液中に、ウイルス抗原を露出するためのウイルス粒子破壊剤が存在すれば十分である。特にウイルス粒子内部に存在するウイルス抗原においては、ウイルス粒子破壊剤は必須である。

一般的なウイルス粒子は、ゲノムである核酸とコア抗原が複合体を形成して粒子を形成し、その粒子を脂質膜とエンベロープタンパク質からなる外膜が覆った構造をしていると考えられている。さらに血液中では低密度リポ蛋白質(LDL)やウイルスに対する

抗体などとの複合体を形成して存在していると考えられている。そのため、血液中に存在するウイルス粒子のままでは、プローブはウイルス抗原特にウイルス粒子内部の抗原を認識し結合することが出来ない。故にウイルス抗原を検出するためには、ウイルス抗原を取り囲むこれらの構造物を除去するなどの処理をして、ウイルス抗原がプローブに認識されるようにする必要がある。

すなわち本発明においては、検体中に含まれるウイルス粒子中のウイルス抗原を、ウイルス抗原を認識するためのプローブが認識できるように露呈させる反応条件、反応させる系からなる反応方法、および反応させる系を含む試薬をも提供する。

本発明が提供する系における抗原検出に適した反応系とは、ウイルス抗原エпитープに対する抗体の機能を失わせない程度のマイルドな条件でありながら、検体中に存在する複雑な構造体であるウイルス粒子から、ウイルス抗原を認識するプローブである抗体の認識する領域を十分に露呈させる条件からなる系である。

H C V においては、すでに超遠心法にて分離したウイルス粒子 (T a k a h a s h i e t a l . , 1 9 9 2 , J . G e n . V i r o l , 7 3 : 6 6 7 - 6 7 2) 、 ポリエチレングリコールによって凝集沈殿させた H C V 粒子を T w e e n 8 0 や T r i t o n X 1 0 0 の様な非イオン性の界面活性剤によって処理することにより (K a s h i w a k u m a e t a l . , 1 9 9 6 , J . I m m u n o l o g i c a l m e t h o d s : 1 9 0 : 7 9 - 8 9) 、 コア抗原が検出可能であることが示されているが、前者においてはその検出感度が不十分であり、十分に抗原が露呈されているかは疑問である。また後者においては他の処理剤を加えることにより抗体を失活させており、界面活性剤の効果そのものについては触れられていない。

本発明においては、始めに界面活性剤を基本に条件を検討し、反応液を界面活性剤を中心とした組成にすることにより、遠心操作や加熱などの操作からなる前処理操作を適用することなく、単に反応液中で検体を希釈することのみにより、ウイルス粒子中の抗原を効率良く検出することが可能となった。

効果的にウイルス粒子中からウイルス抗原を抽出し、かつ血清中の様々な物質との相互反応を抑制し、効率よくプローブと抗原とが反応できる条件を与えることが必要である。この際の効果的な界面活性剤としては、炭素数10個以上のアルキル基と第2、第3または第4級アミンを同一分子内に有する界面活性剤、又は非イオン性界面活性剤が挙げられる。

前記アルキル基と第2、第3または第4アミンを有する界面活性剤において、アルキル基は好ましくは直鎖アルキル基であり、その炭素原子数は好ましくは10個以上、さらに好ましくは10～20個である。アミンとしては第3級アミン又は第4級アミン（アンモニウム）が好ましい。具体的な界面活性剤としては、ドデシル-N-サルコシン酸、ドデシルトリメチルアンモニウム塩、セチルトリメチルアンモニウム塩、3-（ドデシルジメチルアンモニオ）-1-プロパンスルホン酸、3-（テトラデシルジメチルアンモニオ）-1-プロパンスルホン酸、ドデシルピリミジウム塩、セチルピリジウム塩、デカノイル-N-メチルグルカミド（MEGA-10）、ドデシル-N-ベタイン等が挙げられる。ドデシル-N-サルコシン酸及びドデシルトリメチルアンモニウム塩が好ましい。

前記の非イオン性界面活性剤としては12～14の間の親水疎水比を有するものが好ましく、ポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル類、例えばTriton X100、Triton X114など、あるいはポリオキシエチレンノニファニルエーテル

類、例えば Nonidet P40、Triton N101、Nikkol NP 等が好ましい。

本発明においては、上記 2 つのタイプの界面活性剤を単独で用いてもよいが、併用するのが一層好ましく、併用により相乗効果が得られる。

さらに、尿素など、水環境を変化させるような因子を加えてもよい。

本発明によって示されるプローブとしてのモノクローナル抗体

本発明でいう HCV の構造蛋白質遺伝子断片とは、HCV の構造蛋白質遺伝子のコア領域を含む遺伝子断片であり、少なくとも HCV の N 末端の 1 番目から 160 番目のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする塩基配列を有する DNA 断片である。具体的には、配列番号 2 のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む遺伝子断片である。

本発明でいう HCV 抗原活性を有するポリペプチドとは、抗 HCV 抗体と免疫学的に反応する融合ポリペプチドもしくはポリペプチドを意味し、本発明のハイブリドーマならびにそれから得られるモノクローナル抗体の作製に利用するための抗原として用いることができる。具体的には、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む HCV 抗原活性を有する融合ポリペプチドもしくは配列番号 1 のアミノ酸配列の一部を含む HCV 抗原活性を有するポリペプチドであり、その N 末端あるいは C 末端に余分なアミノ酸配列が付加されたものであってもよい。

本発明の上記融合ポリペプチドならびに配列番号 3～6 に示されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドに対するモノクローナル抗体類は、当業者により容易に作製することができる。ハイブリドーマによるモノクローナル抗体の作製は良く知られている。例えば、

BALB/c マウスなどの腹腔内あるいは皮内に、上記融合ポリペプチドもしくはポリペプチド（以下、本抗原）を単独もしくはBSA、KLHなどと結合させた抗原として、単純あるいはフロイント完全アジュバント等のアジュバントと混合して定期的に免疫する。血中の抗体価が上昇した時点で、追加免疫として本抗原を尾静脈内に投与し、無菌的に脾臓を摘出した後、適当なマウス骨髓腫細胞株と細胞融合し、ハイブリドーマを得る。本方法は、KöhlerとMilsteinの方法（Nature 256: 495-497, 1975）に従って行なうことができる。

上記方法により得られたハイブリドーマ細胞株を適当な培養液中で培養し、その後、本抗原に対して特異的な反応を示す抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を選択してクローン化する。抗体産生ハイブリドーマのクローニングには限界希釈法のほか軟寒天法（Eur. J. Immunol. 6: 511-519, 1976）などを利用することができる。そして、産生されたモノクローナル抗体をプロテインAなどを用いたカラムクロマトグラフィーなどの方法により精製する。

上記のモノクローナル抗体以外にもプローブとして用いる分子は作製することが出来る。例えば組換え抗体についてはHoogenboomの総説などに詳しく記載されている（Trends in Biotechnology, 15: 62-70, 1997）。

プローブを用いた検出系

本発明に従って調製されたモノクローナル抗体は、HCV構造蛋白質の検出および定量用に、エンザイムーリンクイムノソルベントアッセイ（ELISA）、酵素イムノドットアッセイ、ラジオイムノアッセイ、凝集に基づいたアッセイ、あるいは他のよく知られているイムノアッセイ法で検査試薬として用いることができる。また

、検出に標識化抗体が使用される場合は、標識化合物としては例えば蛍光物質、化学発光物質、放射性物質、酵素、染色物質などが使用される。

例えば、検体（血清）中のウイルス抗原を検出するためにサンドイッチ反応系を原理とした方法を用いる場合、使用すべき診断キットは、固体支持体（例えばマイクロタイターウェルの内壁）に被覆された本発明の１種類以上のモノクローナル抗体および標識物質と結合させた１種類以上のモノクローナル抗体またはそのフラグメントを含む。固体支持体に固相化するモノクローナル抗体および標識するモノクローナル抗体の組み合わせは自由であり、高感度の得られる組み合わせを選択できる。

使用できる固体支持体としてはポリスチレンやポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリビニール製のマイクロタイタープレート、試験管、キャピラリー、ビーズ（ラテックス粒子や赤血球、金属化合物など）、膜（リポソームなど）、フィルターなどが挙げられる。

発明の効果

本発明により示される方法により、抗体などをプローブとして検出するいわゆる免疫測定方法に適した状態に、ウイルス粒子から簡便にウイルス抗原を遊離させることが可能となる。また本発明によって示される方法によってウイルス粒子を含む検体を処理することにより、抗体などをプローブとして抗原を検出するいわゆる免疫測定方法により、ウイルス抗原を簡便にかつ感度よく検出、及び定量することが可能となる。また本発明によって示される検体処理方法を用いた免疫測定方法を用いた、検体中のウイルスの有無を判別するキット、定量するキット及び診断薬を作製することが可能となる。

。

実施例

以下の実施例は本発明を例証するものであるが、これによって本発明の範囲を制限するものではない。

実施例 1. HCV 由来ポリペプチドの発現および精製

(A) 発現プラスミドの構築

HCV のコア領域に相当する発現プラスミドは以下の方法で構築した。C11-C21 クローンおよび C10-E12 クローン（特開平 6-38765）を pUC119 に組み込んで得られたプラスミド pUC・C11-C21 および pUC・C10-E12 の各 DNA 1 μ g を制限酵素反応液 20 μ l [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM ジチオスレイトール、100 mM NaCl, 15 単位の EcoRI および 15 単位の ClaI 酵素] 中、および [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM ジチオスレイトール、50 mM NaCl, 15 単位の ClaI および 15 単位の KpnI 酵素] 中で各々 37 °C 1 時間消化し、その後 0.8 % アガロースゲル電気泳動を行ない、約 380 bp の EcoRI-ClaI 断片および約 920 bp の ClaI-KpnI 断片を精製した。

この 2 つの DNA 断片と pUC119 を EcoRI および KpnI で消化したベクターに 10 \times リガーゼ用緩衝液 [660 mM Tris-HCl (pH 7.5), 66 mM MgCl₂, 100 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP] 5 μ l, T4 リガーゼ 1 μ l (350 単位/ μ l) に水を加えて 50 μ l とし、16 °C で一晩保温し、連結反応を行なった。このプラスミドを用い大腸菌 JM109 を形質転換させ、プラスミド pUC・C21-E12 を得た。

このプラスミド pUC・C21-E12 DNA 1 ng を 2 つのプライマー (5' - G A A T T C A T G G G C A C G A A T C C T A A A - 3' (配列番号: 7), 5' - T T A G T C C T C C A G A A C C C G G A C - 3' (配列番号: 8)) を用い PCR を行なった。PCR は GeneAmp™ (DNA Amplification Reagent Kit, Perkin Elmer Cetus 製) のキットを用い DNA 変性 95 °C 1.5 分、アニーリング 50 °C 2 分、DNA 合成 70 °C 3 分の条件で行ない、得られた DNA 断片を 0.8 % アガロースゲル電気泳動により分離し、ガラスパウダー法 (Gene Clean) で精製した。

一方、pUC19 を制限酵素 Sma I で消化し、PCR 法によって得られた DNA 断片を 10 × リガーゼ用緩衝液 [660 mM Tris-HCl (pH 7.5), 66 mM MgCl₂, 100 mM ジチオスレトール、1 mM ATP] 5 μl, T4 リガーゼ 1 μl (350 単位/μl) に水を加えて 50 μl とし、16 °C で一晩保温し、連結反応を行なった。このプラスミドを用い大腸菌 JM109 を形質転換させ、プラスミド pUC19・C21-E12・Sma I を得た。このプラスミド DNA 1 μg を制限酵素反応液 20 μl [150 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl (pH 7.5), 6 mM MgCl₂, 15 単位の EcoRI および 15 単位の BamHI 酵素] 中で 37 °C 1 時間消化反応を行ない、その後 0.8 % アガロースゲル電気泳動を行ない、約 490 bp の EcoRI - BamHI 断片を分離し、これをガラスパウダー法で精製した。

次に発現ベクターである Trp・TrpE (特開平 5-84085) の DNA 1 μg を制限酵素反応液 20 μl [150 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl (pH 7.5), 6 mM MgCl₂, 15 単位の EcoRI および 15 単位の BamHI 酵素] 中で 37 °C で 1 時間消化し、その反応液に水 39 μl を加え、70 °C で 5 分間

熱処理した後にバクテリアアルカリ性ホスファターゼ (BAP) 1 μ l (250 単位/ μ l) を加えて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間保温した。

この反応液にフェノールを加えてフェノール抽出を行ない、得られた水層をエタノール沈殿し、沈殿物を乾燥した。得られた EcoRI - BamHI 処理ベクター DNA 1 μ g と上述のコア 140 断片を 10 \times リガーゼ用緩衝液 [660 mM Tris-HCl (pH 7.5), 66 mM MgCl₂, 100 mM ジチオスレオール、1 mM ATP] 5 μ l, T4 リガーゼ 1 μ l (350 単位/ μ l) に水を加えて 50 μ l とし、16 $^{\circ}$ C で一晩保温し、連結反応を行なった。

この反応液の 10 μ l を用いて大腸菌 HB101 株を形質転換した。形質転換に用いる感受性大腸菌株は塩化カルシウム法 [Mandel, M. と Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159-162 (1970)] により作られる。形質転換大腸菌を 25 μ g/ml のアンピシリンを含む LB プレート (1% トリプトン、0.5% NaCl, 1.5% 寒天) 上に塗布し、37 $^{\circ}$ C に一晩保温した。プレート上に生じた菌のコロニーを 1 白金耳取り、25 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 培地に移し、一晩 37 $^{\circ}$ C で培養した。1.5 ml の菌培養液を遠心して集菌し、プラスミド DNA のミニプレパレーションをアルカリ法 [Maniatis ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (1982)] により行なった。

得られたプラスミド DNA 1 μ g を制限酵素反応液 20 μ l [150 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl (pH 7.5), 6 mM MgCl₂, 15 単位の EcoRI および 15 単位の BamHI 酵素] 中で 37 $^{\circ}$ C、1 時間消化し、アガロースゲル電気泳動を行なって、約 490 bp の EcoRI - BamHI 断片が生じる Trp⁺ TrpE コア 160 発現プラスミドを選別した。

(B) クローンコア 160 でコードされるポリペプチドの発現および精製

発現プラスミド Trp⁺ Trp⁻E コア 160 をもつ大腸菌 HB 101 株を 50 μ g/ml のアンピシリンを含む 3 ml の 2 Y T 培地 (1.6% トリプトン、1% 酵母エキス、0.5% NaCl) に接種し、37°C で 9 時間培養する。この培養液 1 ml を 50 μ g/ml のアンピシリンを含む 100 ml の M9-C A 培地 (0.6% Na₂HPO₄, 0.5% KH₂PO₄, 0.5% NaCl, 0.1% NH₄Cl, 0.1 mM CaCl₂, 2 mM MgSO₄, 0.5% カザミノ酸、0.2% グルコース) に植え継ぎ、37°C で培養した。OD₆₀₀ = 0.3 の時に終濃度 40 mg/l になるようにインドールアクリル酸を加え、さらに 16 時間培養した。この培養液を遠心分離して菌体を集めた。

菌体に 20 ml の緩衝液 A [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 30 mM NaCl] を加えて懸濁し、再び遠心分離を行なって発現菌体 2.6 g を得た。得られた菌体を緩衝液 A 10 ml 中に懸濁し、超音波破碎により大腸菌膜を破碎した後に遠心分離を行ない、HCV cDNA でコードされるポリペプチドと Trp⁺E の融合ポリペプチドを含む不溶性画分を得た。その画分に 10 ml の 6 M 尿素を含む緩衝液 A を加えて融合ポリペプチドを可溶化抽出した。可溶化した抽出物を S-Sepharose を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーにかけて、融合ポリペプチドの精製を行なった。

実施例 2. ハイブリドーマの作製法

前記方法により調製した融合ポリペプチド (Trp⁺C11) を 6 M 尿素溶解後、0.15 M NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.3) に終濃度が 0.2 ~ 1.0 mg/ml となるように希釈し、

等量のアジュバント（タイターマックス）と混和し、T r p C 1 1 懸濁液とした。T r p C 1 1 濃度が0. 1 ~ 0. 5 mg/mlとなるように調製した該懸濁液を4 ~ 6 週令のB A L B / c 系マウスに腹腔内投与した。2 週間ごとに同様の免疫を行いさらに約2 週間後、生理食塩水に溶解したT r p C 1 1 1 0 μ g を尾静脈内に投与した。

最終追加免疫後3 日目に、この免疫動物より無菌的に脾臓を摘出し、ハサミで切片としてさらにメッシュを用いて脾臓を個々の細胞にほぐし、R P M I - 1 6 4 0 培地で3 回洗浄した。対数増殖期のマウス骨髓腫細胞株S P 2 / 0 A g 1 4 を前記と同様に洗浄後、該細胞2. 5 6 $\times 10^7$ 個と脾臓細胞1. 6 4 $\times 10^8$ 個を5 0 ml 容の遠心管に入れ混合した。2 0 0 $\times g$ 、5 分間遠心分離を行ない、上清を除去し、3 7 $^{\circ}\text{C}$ に保温した5 0 % ポリエチレングリコール（P E G）4 0 0 0 （メルク社製）を含むR P M I - 1 6 4 0 培地1 ml を加え、さらにR P M I - 1 6 4 0 培地1 0 ml を加えて細胞融合させた。

融合細胞は、遠心分離（2 0 0 $\times g$ 、5 分間）によってP E G を除いた後、9 6 ウエルプレートを用いて、1 0 % ウシ胎児血清ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン（以下、H A T と省略）を含むR P M I - 1 6 4 0 培地中で約1 0 日間培養してハイブリドーマのみを増殖させた。その後、目的の抗体を産生するクローンをE L I S A 法により検索し、所望の反応特異性を有する本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得た。

得られたハイブリドーマについて、常法の限界希釈法に従い、単一クローン化を行ない、得られたハイブリドーマをH C 1 1 - 1 1 , H C 1 1 - 1 4 , H C 1 1 - 1 0 、およびH C 1 1 - 3 、およびH C 1 1 - 7 と命名した。該4 種類のハイブリドーマは、工業技術

院生工学工業技術研究所に平成9年7月4日付でそれぞれFERM BP-6005, FERM BP-6006, FERM BP-6004, FERM BP-6002及びFERM BP-6003として寄託された。

実施例3. モノクローナル抗体の作製法

実施例2に記載の方法により得られたハイブリドーマをプリスタン等で処理したマウス腹腔に移植し、腹水中に産生されてくるモノクローナル抗体を取得した。該モノクローナル抗体の精製は、プロテインAを結合させたセファロースカラムによりIgGフラクションを分離した。

前記5種類のハイブリドーマから産生されたそれぞれのモノクローナル抗体、C11-14, C11-11, C11-10, C11-7およびC11-3のアイソタイプは、ウサギ抗マウスIg各アイソタイプ抗体（Zymed社製）を用いたイムノアッセイにより、C11-10及びC11-7がIgG2aであり；CH11-11, C11-14及びC11-3がIgG1であることが明らかとなった。得られた5種類のモノクローナル抗体について、HCV・コア領域由来の配列によって合成した20アミノ酸からなる合成ペプチドを用いてエピトープ解析を行なった結果、表1に示す如くコア領域の一部を特異的に認識するモノクローナル抗体であることがわかった。

表 1

抗 体	認 識 部 位
C 11-14	$^{41}\text{Gly}-^{50}\text{Arg}$ (配列番号 4)
C 11-10	$^{21}\text{Asp}-^{40}\text{Arg}$ (配列番号 3)
C 11-3	$^{100}\text{Pro}-^{120}\text{Gly}$ (配列番号 5)
C 11-7	$^{111}\text{Asp}-^{130}\text{Phe}$ (配列番号 6)
C 11-11	$^{100}\text{Pro}-^{120}\text{Gly}$ (配列番号 5)

実施例 4. 検体処理条件検討

1) S D S 濃度検討

健常人血清および H C V - R N A 陽性血清 $100\mu\text{l}$ に、種々の濃度に溶解した S D S と 0.6% C H A P S を含んだ処理液を $100\mu\text{l}$ 添加した。 56°C に設定している保温箱に入れて 30 分間処理をおこない、その $80\mu\text{l}$ を測定試料とした。以下に記す測定法による結果を、横軸に処理反応時の S D S 濃度を取り、図 1 に示した。

2) C H A P S 濃度検討

健常人血清および H C V - R N A 陽性血清 $100\mu\text{l}$ に、種々の濃度に溶解した C H A P S と 5% S D S を含んだ処理液を $100\mu\text{l}$ 添加した。 56°C に設定している保温箱に入れて 30 分間処理をおこない、その $80\mu\text{l}$ を測定試料とした。以下に記す測定法による結果を、横軸に処理反応時の C H A P S 濃度を取り、図 2 に示した。

3) 尿素濃度検討

健常人血清および H C V - R N A 陽性血清 $100\mu\text{l}$ に、種々の濃度に溶解した尿素を含んだ処理液 (5% S D S, 0.6% C H A P S) を $100\mu\text{l}$ 添加した。 56°C に設定している保温箱に入れて 30 分間処理をおこない、その $80\mu\text{l}$ を測定試料とした。以下

に記す測定法による結果を、横軸に処理反応時の尿素濃度を取り、図3に示した。

4) Triton X 100 濃度検討

健常人血清およびHCV-RNA陽性血清100 μ lに、種々の濃度に溶解したTriton X 100を含んだ処理液(5% SDS, 0.6% CHAPS, 6M尿素)を100 μ l添加した。56℃に設定している保温箱に入れて30分間処理をおこない、その80 μ lを測定試料とした。以下に記す測定法による結果を、横軸に処理反応時のTriton X 100濃度を取り、図4に示した。

5) 反応温度検討

健常人血清およびHCV-RNA陽性血清100 μ lに、処理液(5% SDS, 0.6% CHAPS, 6M尿素、0.75% Triton X 100)を100 μ l添加した。4℃、室温(23℃)、37℃、45℃、56℃、70℃で30分間処理をおこない、その80 μ lを測定試料とした。以下に記す測定法を用いて検討した結果を図5に示した。

測定法

血清処理法の検討で得られた試料は各々以下の測定法を用いて評価した。すなわち、抗HCVコア抗原モノクローナル抗体(抗体C11-3とC11-7の等量混合)を終濃度が計6 μ g/mlになるように0.1M炭酸緩衝液(pH9.6)で希釈し、96ウエルマイクロプレート(ヌンク社製)1ウエルにつき100 μ lずつ分注した。4℃で一晩静置後、0.15M NaClを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.3)0.35mlを用いて2回洗浄し、0.5%カゼイン-Naを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.35)(以下ブロッキング液)、0.35mlを添加し、さらに室温で2時間静置した。

ブロッキング液除去後、0.15 M NaCl, 1% BSA, 0.5% カゼイン-Na, 0.05% Tween 20 を含む 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.3) 160 μ l と各々の血清処理法で得られた測定試料をそれぞれのウェルに加え、室温で2時間反応させ、洗浄液 300 μ l で5回洗浄し、さらにペルオキシダーゼ (POD) 標識したモノクローナル抗体 (C11-10 と C11-14 の等量混合) 100 μ l を添加して室温で30分間反応させた。反応後、上記洗浄液 300 μ l で5回洗浄し、基質 (オルトフェニレンジアミン、以下 OPD) 溶液 100 μ l を加え室温で30分間反応させた後、2 N 硫酸溶液 100 μ l を添加し、波長 630 nm の吸光度を対照として波長 492 nm における吸光度 (OD 492) を測定した。

図1～4から、各々の処理条件の最適化が行われたが、未処理検体ではコア抗原の検出が困難であったが、このような簡易な処理を行うことによって、劇的にコア抗原の検出が可能となった。特に、処理反応時の SDS 濃度は 0.5% 以上で、CHAPS 濃度は 0.1% 以上で、尿素濃度は 1 M 以上で、Triton X100 濃度は 0.1～0.75% で使用することで、4℃から70℃の範囲で、良好にコア抗原を検出できることが示された。

実施例 5. 構造領域コア抗原の検出および測定法 (1)

血清 100 μ l に、処理液 (5% SDS, 0.6% CHAPS, 6 M 尿素、0.75% Triton X100) を 100 μ l 添加した。56℃に設定している保温箱に入れて30分間処理をおこない、その 120 μ l を測定試料とした。

抗 HCV コア抗原モノクローナル抗体 (C11-3 と C11-7 等量混合) を終濃度が計 6 μ g/ml になるように 0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で希釈し、96 ウェルマイクロプレート (ヌンク社

製) 1 ウェルにつき 100 μ l ずつ分注した。4 $^{\circ}$ Cで一晩静置後、0.15M NaClを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.3) 0.35mlを用いて2回洗浄し、ブロッキング液0.35mlを添加し、さらに室温で2時間静置した。

ブロッキング液を除去後、反応緩衝液120 μ lと前述した処理法で得た測定試料をそれぞれのウェルに加え、室温で2時間反応させた。洗浄液300 μ lで5回洗浄し、さらにペルオキシダーゼ(POD)標識したモノクローナル抗体(C11-10とC11-14:等量混合)100 μ lを添加して室温で30分間反応させた。洗浄液300 μ lで5回洗浄し、基質(OPD)溶液100 μ lを加え室温で45分間反応させた後、2N硫酸溶液100 μ lを添加し、波長630nmの吸光度を対照として波長492nmにおける吸光度(OD492)を測定した。尚、標準血清として、パネル血清50を1U/mlとして、1%BSAを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.3)で段階的に希釈したものについて同様に処理をおこない測定した。

図6に、標準血清として使用したパネル血清50の希釈直線を示した。試料中コア抗原が濃度依存的に測定されており、約0.5mU/mlの検出が可能であった。すなわち、本発明の極めて簡易な検体処理法とモノクローナル抗体を組み合わせる用いることにより、HCVコア抗原を検出または定量できることが明らかとなった。

実施例6. HCV構造領域コア抗原の検出および定量(2)

アルカリフォスファターゼ標識モノクローナル抗体を用いた方法

固相担体として96ウェル黒マイクロプレート(ヌング社)を、標識抗体としてアルカリフォスファターゼ標識モノクローナル抗体を、基質としてCDPstar(増感剤としてエメラルドII)を使用した。標準血清として使用したパネル血清50の希釈直線を図7

に示したが、試料中コア抗原が濃度依存的に測定されており、約 0.5 mU/ml の検出が可能であった。このアルカリフォスファターゼ標識モノクローナル抗体を用いた測定法を用いても、HCV コア抗原を検出または定量できることが明らかとなった。

実施例 7. 溶血血清による感度低下を抑えるための添加剤の検討

血清成分の感度に与える影響を検討したところ、ヘモグロビンを加えると著しく感度が低下することが確認された。SDS, CHAPS 又は Triton X100 を含む前処理剤による前処理により、ヘモグロビンが変性し、遊離したヘムの影響である可能性が考えられた。そこで、変性ヘモグロビンの影響を軽減することのできる添加剤を前処理剤に加え検討した。

HCV コア抗原陽性血清（パネル血清 No 3）に、高濃度ヘモグロビン（国際試薬製：干渉チェック）を添加してモデル検体を作製し、前述の前処理剤に尿素を添加して、実施例 6 に準じてコア抗原測定をおこない、尿素の添加効果を検討した。コントロールとしたヘモグロビン無添加群のコア抗原活性量を 100% としたときの 430 mg/dl ヘモグロビン添加群のコア抗原活性量を表 2 にあらわした。尿素無添加のときのヘモグロビン添加群のコア抗原活性量は約 30% に減少したが、添加尿素量の増加により、ヘモグロビン添加群のコア抗原活性量が増加し、ヘモグロビンによる干渉作用が減じていることが確認された。

表 2. 尿素のヘモグロビンによる干渉の抑制効果

添加剤	対照に対する %
添加なし	30.0
0.5M 尿素	36.3
1 M 尿素	39.7
2 M 尿素	43.0
3 M 尿素	48.8
4 M 尿素	53.7

一方各種アミノ酸とヘムとの相互作用、アミノ基やカルボキシル基による緩衝能効果なども考えられたため、各種アミノ酸を添加し、その効果の度合いを調べた。結果を表 3 に示した。

表 3. 各種アミノ酸のヘモグロビンによる干渉の抑制効果

添加剤	対照に対する %
添加なし	22.7
0.1M ヒスチジン	53.7
0.1M トリプトファン	70.8
0.1M フェニルアラニン	45.8
0.1M ロイシン	25.9
0.1M グルタミン	36.1
0.1M リジン	42.1
0.1M アルギニン	31.4
0.1M グルタミン酸	49.8
0.1M グリシン	39.1
0.1M プロリン	31.2
0.1M セリン	32.5

干渉の抑制効果がもっとも認められたものはトリプトファン及び

ヒスチジンであった。これらの干渉抑制効果の濃度依存性を検討した結果を表 4 に示した。

表 4. ヒスチジン及びトリプトファンの
ヘモグロビンによる干渉の抑制効果

添加剤	対照に対する %
添加なし	24.2
0.05M ヒスチジン	49.3
0.1M ヒスチジン	59.4
0.15M ヒスチジン	74.5
0.2M ヒスチジン	77.0
0.05M トリプトファン	58.7
0.1M トリプトファン	71.5
0.15M トリプトファン	77.9
0.2M トリプトファン	89.0

ヘムはヘモグロビン中でヒスチジンの側鎖により配位され、ヘモグロビン中に保持されていることから、この効果は側鎖によるものであることが示唆された。そこでヒスチジンの側鎖であるイミダゾール、トリプトファンの側鎖であるインドール環を含むインドールアクリル酸の効果を検討した結果を表 5 に示した。

表 5. イミダゾール及びインドールアクリル酸の
ヘモグロビンによる干渉の抑制効果

添加剤	対照に対する %
添加なし	22.1
0.05M イミダゾール	35.2
0.1M イミダゾール	42.0
0.15M イミダゾール	58.8
0.2M イミダゾール	70.7
5 mM インドールアクリル酸	50.4
10mM インドールアクリル酸	69.0
20mM インドールアクリル酸	90.3
30mM インドールアクリル酸	96.8

インドール、およびインドールアクリル酸を反応液中に加えた場合、アミノ酸を加えた場合と同様に濃度依存的なヘモグロビンの干渉抑制効果が認められた。このことから反応液にイミダゾール環を含む物質、たとえばヒスチジンまたはインドール環を含む物質、たとえばトリプトファンを加えることにより、ヘモグロビンを含む検体でも感度良くコア抗原を検出できることが分かった。

上記の各種添加剤を組み合わせた場合の効果を検討した。結果を表 8 に示した。ヒスチジンとトリプトファンを組み合わせることにより、90%以上回復し、尿素を組み合わせることによりさらに検出感度が上昇した。

表 6

添加剤	対照に対する %
0.1Mヒスチジン/ 0.1Mトリプトファン	91.1
4 M尿素/0.1M Tris/ 0.1Mヒスチジン	112.6

実施例 8. 血清処理と測定法で認識されている分子形の解析

パネル血清 13 の 0.25 ml を各々の血清処理法で処理し、ゲルロカラム (Superdex 200 HR, 1 x 30) で分画し、それらのフラクション中の抗コア免疫活性を測定し、その結果を図 8 に示した。分子量約 20 ~ 30 kDa の分子を認識していると考えられ、ウイルス中のコア抗原は前述した前処理によって、ウイルス破壊および血清中に存在する抗コア抗体の不活化により、遊離されていることが示された。

実施例 9. 血清試料中の HCV 構造領域コア抗原の測定法

PCR 法であるアンプリコア HCV モニターキット (ロッシュ社) を用いて、HCV-RNA 量が $10^3 \sim 10^7$ コピー/ml と測定された血清と健常人血清を用い、前述の方法で、血清中の HCV コア抗原の定量を行なった。

また、標準血清として、パネル 50 血清 (1 U/ml と設定) を 1% BSA を含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.3) にて段階的に希釈し、同様に処理したものを用い、表 7 にその測定結果を示した。今回測定した検体のうち、健常人検体は全て検出限界以下であり、PCR 法陽性例の全てを検出できた。このときの相関性を図 9 に示したが、PCR 法との相関係数も 0.8 以上となり高い相関性を示した。

表 7. HCV-RNA量とコア抗原量

SAMPLE #	RNA (K コピー / ml)	コア抗原 (mU / ml)
健常人血清	1	N. D
	2	N. D
	3	N. D
	4	N. D
	5	N. D
パネル血清	81	2.1
	80	2.1
	82	8.5
	33	3.7
	31	37.0
	26	266.7
	39	63.8
	41	116.1
	16	133.7
	50	1000
	45	277.3
	13	1806

N. D : Not detect

実施例 10. 検体処理条件検討

処理条件検討

1) 塩酸グアニジン濃度検討

健常人血清およびHCV-RNA陽性パネル血清100 μ lに、種々の濃度に溶解した塩酸グアニジンと0.5N HClを含む処理液を100 μ l添加した。室温で30分間処理をおこない、その80 μ lを測定試料とした。以下に記す測定法による結果を、横軸に処理反応時の塩酸グアニジン濃度を取り、図10に示した。

2) Triton X100濃度検討

健常人血清およびHCV-RNA陽性パネル血清100 μ lに、種々の濃度に溶解したTriton X100含む処理液(6M塩酸グアニジン、0.5N HCl)を100 μ l添加した。室温で30分間処理をおこない、その80 μ lを測定試料とした。以下に記す測定法による結果を、横軸に処理反応時のTriton X100

濃度を取り、図 1 1 に示した。

3) Tween 20 濃度検討

健常人血清および HCV-RNA 陽性パネル血清 100 μ l に、種々の濃度に溶解した Triton X 100 含む処理液 (6 M 塩酸グアニジン、0.5 N HCl, 12.5 % Triton X 100) を 100 μ l 添加した。室温で 30 分間処理をおこない、その 80 μ l を測定試料とした。以下に記す測定法による結果を、横軸に処理反応時の Tween 20 濃度を取り、図 1 2 に示した。

4) 反応温度検討

健常人血清および HCV-RNA 陽性パネル血清 100 μ l に、処理液 (6 M 塩酸グアニジン、0.5 N HCl, 12.5 % Triton X 100, 0.75 % Tween 20) を 100 μ l 添加した。4 $^{\circ}$ C、室温 (23 $^{\circ}$ C)、37 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C で 30 分間処理をおこない、その 80 μ l を測定試料とした。以下に記す測定法を用いて検討した結果を図 1 3 に示した。

測定法

上記の各々の血清処理法によって得られた試料は、以下の測定法を用いて評価した。すなわち、抗 HCV コア抗原モノクローナル抗体 (抗体 C 1 1 - 1 4 と C 1 1 - 1 1 の等量混合) を終濃度が計 6 μ g/ml になるように 0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で希釈し、96 ウェルマイクロプレート (ヌンク社製) 1 ウェルにつき 100 μ l ずつ分注した。4 $^{\circ}$ C で一晩静置後、0.15 M NaCl を含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.3) 0.35 ml を用いて 2 回洗浄し、0.5 % カゼイン-Na を含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.35)、(以下ブロッキング液) 0.35 ml を添加し、さらに室温で 2 時間静置した。

ブロッキング液除去後、0.15 M NaCl, 1 % BSA, 0

、 5 % カゼイン-Na, 0. 05 % Tween 20 を含む 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7. 3) 140 μ l と 1 M トリス 20 μ l を混合したもの計 160 μ l (以下反応緩衝液とする) と、前述した処理法で得られた測定試料 80 μ l をそれぞれのウェルに加え、室温で 2 時間反応させ、洗浄液 300 μ l で 5 回洗浄し、さらにペルオキシダーゼ (POD) 標識したモノクローナル抗体 (C11-10) 100 μ l を添加して室温で 30 分間反応させた。反応後、上記洗浄液 300 μ l で 5 回洗浄し、基質 (オルトフェニレンジアミン、以下 OPD) 溶液 100 μ l を加え室温で 30 分間反応させた後、2 N 硫酸溶液 100 μ l を添加し、波長 630 nm の吸光度を対照として波長 492 nm における吸光度 (OD 492) を測定した。

図 10 ~ 13 から、処理条件の最適化が行われたが、パネル血清において、未処理検体ではコア抗原の検出が困難であったが、このような極めて簡易な処理を行うことによって、劇的にコア抗原の検出が可能となった。いずれの場合でも、健常人ではシグナルの上昇は認められなかった。また、特に塩酸グアニジン濃度は 2 M 以上で、Triton X 100 濃度は 2 % 以上で使用することで、4 °C から 45 °C の範囲で、良好にコア抗原を検出できることが示された。

実施例 11. コア抗原の検出および測定法

血清 100 μ l に、処理液 (6 M 塩酸グアニジン、0. 5 N HCl, 12. 5 % Triton X 100, 0. 75 % Tween 20) を 100 μ l 添加した。室温で 30 分間処理をおこない、その 100 μ l を測定試料とした。

抗 HCV コア抗原モノクローナル抗体 (C11-14 と C11-11 等量混合) を終濃度が計 6 μ g/ml になるように 0. 1 M 炭酸緩衝液 (pH 9. 6) で希釈し、96 ウェルマイクロプレート (ヌン

ク社製) 1 ウエルにつき 100 μ l ずつ分注した。

4 $^{\circ}$ Cで一晩静置後、0.15M NaClを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.3) 0.35mlを用いて2回洗浄し、ブロッキング液0.35mlを添加し、さらに室温で2時間静置した。ブロッキング液を除去後、反応緩衝液150 μ lと前述した処理法で得た測定試料をそれぞれのウエルに加え、室温で2時間反応させた。

洗浄液300 μ lで5回洗浄し、さらにペルオキシダーゼ(POD)標識したモノクローナル抗体(C11-10) 100 μ lを添加して室温で3分間反応させた。洗浄液300 μ lで5回洗浄し、基質(OPD)溶液100 μ lを加え室温で45分間反応させた後、2N硫酸溶液100 μ lを添加し、波長630nmの吸光度を対照として波長492nmにおける吸光度(OD492)を測定した。尚、標準血清として、パネル血清50を1U/mlとして、1%BSAを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.3)で段階的に希釈したものについて同様に処理をおこない測定した。

図14に、標準血清として使用したパネル血清50の希釈直線を示した。試料中コア抗原が濃度依存的に測定されており、約0.5mU/mlの検出が可能であった。すなわち、本発明の極めて簡易な検体処理法とモノクローナル抗体を組み合わせるにより、コア抗原を検出または定量できることが明らかとなった。

実施例12. 血清処理と測定法で認識されている分子形の解析

パネル血清13の0.25mlを各々血清処理法で処理し、ゲルロカラム(Superdex200HR, 1x30)で分画し、それらのフラクション中の抗コア免疫活性を測定し、その結果を図15に示した。分子量約20~30kDaの分子を認識していると考えられ、ウイルス中のコア抗原は前述した前処理によって、ウイル

ス破壊および血清中に存在する抗コア抗体の不活化により、様々な相互作用から遊離されていることが示された。

実施例 13. 血清試料中のコア抗原の測定法

P C R 法であるアンプリコア H C V モニターキット（ロッシュ社）を用いて H C V - R N A 量が $10^3 \sim 10^7$ コピー／ml と測定された血清と健常人血清を用い、前述の方法で、血清中の H C V コア抗原の定量を行なった。

また、標準血清として、パネル 50 血清（1 U／ml と設定）を 1 % B S A を含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.3）にて段階的に希釈し、同様に処理したものを用い、表 8 にその測定結果を示した。今回測定した検体のうち、健常人検体は全て検出限界以下であり、P C R 法陽性例の全てを検出できた。このときの相関性を図 16 に示したが、P C R 法との相関係数も 0.8 以上となり高い相関性を示した。

表 8. HCV-RNA量とコア抗原量

サンプルNo.	RNA (K コピー / ml)	コア抗原 (mU / ml)
健常人血清	1	—
	2	—
	3	—
	4	—
	5	—
	6	—
	7	—
パネル血清	1	50
	7	830
	8	26
	11	240
	13	1600
	15	25
	16	400
	19	840
	26	87
	31	30
	33	16
	39	97
	41	170
	44	180
	49	33
	50	1000
	84	8.7
		166.4
		471.1
		61.5
		107.4
		1426
		40.1
		240.3
		1369
		1093
		45.8
		58.5
		89.0
		43.9
		57.5
		47.7
		1005
		63.5

N. D : Not detect

実施例 14. B型肝炎ウイルス (HBV) コア抗原の検出

HCVのコア抗原検出に関して述べてきたが、この処理法が他のウイルス中の構造蛋白質の検出に応用可能かどうか検討した。

HBVコア抗原に対するモノクローナル抗体 (特殊免疫研究所) を $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように 0.1 M 炭酸緩衝液 ($\text{pH} 9.6$) で希釈して、96 ウェルマイクロプレートに $100 \mu\text{l}$ ずつ分注した。4℃で一晩静置した後、りん酸緩衝液で洗浄し、1% BSA 溶液を $350 \mu\text{l}$ ずつ分注した。室温で2時間静置したのち、1% BSA 溶液を吸引除去し、反応液 $200 \mu\text{l}$ を添加した。

組換え HBV コア抗原をスタンダードとして用い、B型肝炎と診

断され、HBs抗原が陽性で抗HBs抗体が陰性である患者血清5例と健常人血清10例を検体として用いた。検体100 μ lに、処理試薬(7.5%SDS, 0.75%CHAPS, 0.15%Triton X-100, 2M尿素、0.1Mヒスチジン、0.1Mトリプトファン)を50 μ l添加し56 $^{\circ}$ Cで30分間処理した。処理後、その50 μ lを反応液が満たされたウェルに添加し、室温で90分間反応させた。

比較(前処理無し)として、各サンプル100 μ lに精製水50 μ lで希釈しその50 μ lを反応に用いた。洗浄液で5回洗浄後、ビオチン標識抗HBVコアモノクローナル抗体(HBc-2, HBc-5, HBc-14等量混合)を添加し、室温で30分間反応させた。洗浄液で5回洗浄後、アビジン標識アルカリフォスファターゼを添加し、室温で30分間反応させた。

洗浄液で5回洗浄後、CDPstar(増感剤としてエメラルド1Iを使用)を添加し、室温で15分間反応させ、その相対発光強度を測定した。段階的に希釈した組換えHBVコア抗原の標準曲線を図17に示し、測定されたサンプル中のコア抗原量を表9に示した。検出限界は、21ng/mlで、コア抗原陽性と陰性を振り分けるカットオフ値は60ng/mlとしたところ、健常人血清では、10例全て前処理、無前処理どちらにおいてもコア抗原は陰性となり、B型肝炎患者血清においては、無前処理では検出されなかったが、前処理をおこなうことにより全例でコア抗原が陽性と判定された。

B型肝炎患者血清においては、前処理によって、ウイルス粒子の破壊および抗HBc抗体が不活化され、検出可能になったと考えられる。以上のように、HCVのみならず、ゲノムとしてDNAをもった例えばHBVなどのウイルスの構造蛋白質を検出する際においても、この検体前処理は有用であることが確認された。HCVの類

縁のウイルスであるフラビウイルス類、H I Vなどのレトロウイルスにおいても同様のことが推察できることはいうまでもない。

表 9

検体番号	前処理 無		前処理 有	
	HBVコア抗原量 (ng/ml)	判定	HBVコア抗原量 (ng/ml)	判定
健常人検体	1	< 21 陰性	< 21	陰性
	2	< 21 陰性	< 21	陰性
	3	< 21 陰性	< 21	陰性
	4	< 21 陰性	< 21	陰性
	5	< 21 陰性	46	陰性
	6	< 21 陰性	< 21	陰性
	7	< 21 陰性	47	陰性
	8	< 21 陰性	< 21	陰性
	9	< 21 陰性	26	陰性
	10	< 21 陰性	56	陰性
HBV検体	11	< 21 陰性	98	陽性
	15	< 21 陰性	94	陽性
	20	< 21 陰性	780	陽性
	21	< 21 陰性	270	陽性
	46	< 21 陰性	630	陽性

実施例 15 . 抗原を前処理操作なしで効率的に検出させるための方法

H C V パーティクルを含む検体を界面活性剤を加えた反応液に希釈し、H C V コア抗原の検出される効率を検討した。

なお H C V コア抗原の検出は、H C V コア抗原に対するモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ酵素免疫アッセイ (E I A) で行

った。実施例 3 で得られたモノクローナル抗体のうち、C 1 1 - 3 と C 1 1 - 7 をコア抗原を補足する抗体として用い、C 1 1 - 1 0 及び C 1 1 - 1 4 を補足されたコア抗原を検出するための抗体として用いた。

E I A は基本的には以下の条件で行った。モノクローナル抗体 C 1 1 - 3 及び C 1 1 - 7 を酢酸緩衝液にそれぞれ $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう希釈した溶液をマイクロタイタープレートに加え、 4°C 一夜保温した。磷酸緩衝液で洗浄し 1 % B S A を含む磷酸緩衝液を加えることによるブロッキング操作を施した。そこに反応液 $100 \mu\text{l}$ 、検体 $100 \mu\text{l}$ を加え、攪拌後、室温で 1.5 時間反応させた。低濃度の界面活性剤を加えた磷酸緩衝液で洗浄することにより未反応物を除いた後、アルカリフォスファターゼで標識したモノクローナル抗体 C 1 1 - 1 0 及び C 1 1 - 1 4 を加え、室温 30 分反応させた。反応終了後、未反応物を低濃度の界面活性剤を加えた磷酸緩衝液で洗浄することにより除き、基質液 (C D P - S t a r / e m e r a l d i l l) を加え室温 20 分反応後、発光量を測定した。

前記反応液中に各種界面活性剤を加えその効果を検討した。H C V に対する抗体の力価が検出感度以下であり、ほとんど H C V に対する抗体を含まないと考えられる H C V 抗原陽性血清を用いて、発光量の多寡によるコア抗原活性を健常人血清の発光量を 1.0 としたときの、それに対する反応比で表わした。その結果を表 1 0 及び表 1 1 に示す。

表 10

健康人血清に対する各血清の反応比率 (S/N ratio)

	No45	No46	No 3	No 7	No19
無添加	15.67	1.00	1.15	1.34	1.19
効果判定基準	>30.0	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0
添加剤	HLB値	%			
陰イオン性 界面活性剤					
ドデシル硫酸ナトリウム	40.0	0.5 2.0	5.42 5.73		
ドデシル-N-サルコシ酸ナトリウム		0.5 2.0	12.79 125.43	2.70 7.27	3.70 6.71
ドデシルトリメチルアミン硫酸S-113		0.5 2.0	10.55 6.72	1.27 0.91	
陽イオン性 界面活性剤					
セチルトリメチルアミンモニウムブロミド		0.5 2.0	72.97 44.55	7.42 5.35	3.09 3.52
ドデシルトリメチルアミンモニウムクロライド		0.5 2.0	53.43 12.44	4.70 2.49	2.05 1.52
n-ドデシルトリメチルアミンモニウム		0.5 2.0	66.84 27.98	4.43 3.77	2.41 1.63
テトラデシルアミンモニウムブロミド		0.05	14.69		
n-オクタシルトリメチルアミンモニウムクロライド		0.5 2.0	12.57 11.46	1.00	0.74
n-ドデシルトリメチルアミンモニウムクロライド		0.5 2.0	17.50 45.21	0.88 1.12	0.80 1.08
両イオン性 界面活性剤					
CHAPS		0.5 2.0	29.57 25.32	1.63	1.82
パ-フルオロアルキルベタインS-132 (ASAHI GLASS製)		0.5 2.0	11.07 10.77	1.61 1.49	
3-(ドデシルトリメチルアミンモニウム)-1-プロパンホスホン酸		0.5 2.0	57.69 113.19	4.57	3.44
					5.26

表 111

健康人血清に対する各血清の反応比率 (S/N ratio)

	No45	No46	No3	No7	No19
無添加	15.67	1.00	1.15	1.34	1.19
効果判定基準	>30.0	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0
添加剤	HLB値		%		
非イオン性 界面活性剤	MEGA-10	0.5 2.0	32.11 38.49	3.38 3.53	1.97 1.87
	Tween 20	16.7 2.0	16.88 12.36		
	Tween 40	15.6 2.0	14.96 19.10	1.02 1.32	0.99 1.25
	Tween 80	15.0 2.0	12.45 17.47	1.33 1.33	1.23 1.10
	Nonidet P-40	13.1 0.5	43.14	3.09	2.95
	オクチルβ-D-グルコシド	0.5 2.0	12.48 25.07	0.90 1.92	0.60 1.20
	Triton N101	13.4 2.0	26.50 60.84	1.85 2.23	1.62 2.28
	Triton X100	13.5 2.0	27.72 71.08	2.90	2.34
	Triton X114	12.4 2.0	31.49 58.62	2.04 1.92	1.65 2.11
	Triton X305	17.3 2.0	10.50 25.91	0.94 1.30	0.97 1.24
その他	Triton X405	17.9 2.0	12.54 24.92	0.86 1.21	0.78 1.24
	ベンジジメチルアミン・ヒメチルトリブチル	0.5 2.0	5.45 7.01	1.00 1.12	
界面活性剤 の混合	トリイタリミン	0.5	3.89	0.97	
	2 % トリイタリミン-N-オクタデシル酸ナトリウム + 2 % Triton X100		244.13	6.11	5.50
					12.71

この結果から、T r i t o n X 1 0 0 に代表されるように、H L B 値が 1 2 ～ 1 4 間を示す非イオン性界面活性剤の添加により、H C V 抗原陽性血清では、健常人血清と比較して発光量が増大し、検出感度が上昇することが判明した。また、同様にドデシル-N-サルコシン酸ナトリウムやドデシルトリメチルアンモニウムに代表されるように、炭素数 1 0 個以上の直鎖アルキル基と第 2 級、第 3 級または 4 級アミンを同時にその構造にもつ界面活性剤の添加により、H C V 抗原陽性血清における検出感度が上昇することも判明した。炭素数 8 以下のアルキル基をもつ前記界面活性剤（n-オクチルトリメチルアンモニウムクロライド）はこのような感度上昇効果は認められなかった。また、これらの 2 種類の界面活性剤を混合（表 1 1 では 2 % ドデシル-N-サルコシン酸ナトリウムと 2 % T r i t o n X 1 0 0 を混合）添加することにより、さらに H C V 抗原陽性血清における検出感度が上昇することも判明した。

実施例 1 6 . H C V 感染後の抗 H C V 抗体出現前（ウインドピリオド期）の検体中のコア抗原検出

市販セロコンバージョンパネル P H V 9 0 5 （B . B . I . i n c . ）を、一次反応液中に 2 % の T r i t o n X 1 0 0 及び 2 % のドデシル-N-サルコシン酸ナトリウムを添加し、実施例 1 5 に準じて測定した。ここで用いた P H V 9 0 5 パネルは、観察開始後 2 1 日目（血清 N o . P H V 9 0 5 - 7 ）に抗 H C V 抗体検査（オルソ E I A . 3 . 0 ）で陽転化を示したものであり、その抗体価はカットオフインデックス（S / C O ）で表され、1 . 0 以上が陽性と判定される。H C V コア抗原活性（発光量）は、健常人血清の発光量を 1 . 0 として、それに対する反応比率（S / N ）で表した。

表 1 2 に示したように、まだ抗 H C V 抗体が陽性となる前にコア

抗原活性が認められ、この界面活性剤の添加により、ウイルス粒子からコア抗原性が露呈し、固相化されたモノクローナル抗体と反応し、検出できていることが確認された。

表 12

血清No.	観察開始後日数	HCV コア抗原活性 (S/N)	抗HCV抗体価 (S/CO)
PHV905-1	0	5.32	0.000
905-2	4	8.30	0.000
905-3	7	15.63	0.000
905-4	11	4.37	0.300
905-5	14	14.75	0.700
905-6	18	7.57	0.700
905-7	21	4.82	2.500
905-8	25	3.31	5.000
905-9	28	1.61	5.000

特許協力条約に基づく規則の第13規則の2に規定する微生物への
言及

寄託機関の名称：工業技術院生命工学工業技術研究所

寄託機関のあて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号

(郵便番号 305)

- | | |
|------------|--------------------------|
| (1) 微生物の表示 | H C 1 1 - 3 |
| 寄託日 | 1997年 7 月 4 日 |
| 寄託番号 | F E R M B P - 6 0 0 2 |
| (2) 微生物の表示 | H C 1 1 - 7 |
| 寄託日 | 1997年 7 月 4 日 |
| 寄託番号 | F E R M B P - 6 0 0 3 |
| (3) 微生物の表示 | H C 1 1 - 1 0 |
| 寄託日 | 1997年 7 月 4 日 |
| 寄託番号 | F E R M B P - 6 0 0 4 |
| (4) 微生物の表示 | H C 1 1 - 1 1 |
| 寄託日 | 1997年 7 月 4 日 |
| 寄託番号 | F E R M B P - 6 0 0 5 |
| (5) 微生物の表示 | H C 1 1 - 1 4 |
| 寄託日 | 1997年 7 月 4 日 |
| 寄託番号 | F E R M B P - 6 0 0 6 |

請 求 の 範 囲

1. ウイルスを含む検体を、（１）陰イオン性界面活性剤及び、（２）両イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤又は蛋白質変性剤のいずれかを含む処理液で処理することを特徴とするウイルス含有検体の処理方法。

2. ウイルスを含む検体を、（１）陰イオン性界面活性剤、（２）両イオン性界面活性剤、及び（３）非イオン性界面活性剤又は蛋白質変性剤のいずれかを含んだ処理液で処理することを特徴とするウイルス含有検体の処理方法。

3. ウイルスを含む検体を、（１）陰イオン性界面活性剤、（２）両イオン性界面活性剤、（３）非イオン性界面活性剤、及び（４）蛋白質変性剤を含んだ処理液で処理することを特徴とするウイルス含有検体の処理方法。

4. 前記処理液が、尿素、イミダゾール環含有化合物又はインドール環含有化合物をさらに含有する、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。

5. 前記イミダゾール環含有化合物がイミダゾール、ヒスチジン、イミダゾールアクリル酸、イミダゾールカルボキシアルデヒド、イミダゾールカルボキサミド、イミダゾールジオン、イミダゾールジチオカルボン酸、イミダゾールジカルボン酸、イミダゾールメタノール、イミダゾリジンチオン、イミダゾリドン、ヒスタミン又はイミダゾピリジンである、請求項４に記載の方法。

6. 前記インドール環含有化合物がトリプトファン、インドールアクリル酸、インドール、インドール酢酸、インドール酢酸ヒドラジド、インドール酢酸メチルエステル、インドール酪酸、インドールアセトニトリル、インドールカルビノール、インドールカルボキ

シアルデヒド、インドールカルボン酸、インドールエタノール、インドール乳酸、インドールメタノール、インドールプロピオン酸、インドールピルビン酸、インドリルメチルケトン、インドーマイシン、インドールアセトン、インドメタシン、インドプロフェン、インドラミンである、請求項 4 に記載の方法。

7. ウイルスを含む検体を、(1) カオトロピックイオン、及び(2) 酸性化剤を含む処理液で処理することを特徴とするウイルス含有検体の処理方法。

8. ウイルスを含む検体を、(1) カオトロピックイオン、(2) 酸性化剤、及び(3) 非イオン性界面活性剤を含む処理液で処理することを特徴とするウイルス含有検体の処理方法。

9. 前記ウイルスが、ゲノムRNA又はDNAを包む構造蛋白質と、それを取り囲む膜蛋白質又は脂質膜から構成される構造を有するウイルス粒子を形成するウイルスである請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

10. 前記ウイルスが、C型肝炎ウイルス(HCV)、D型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、G型肝炎ウイルス、手足口病ウイルス、フラビウイルス(黄熱ウイルス、西ナイルウイルス、日本脳炎ウイルス、デングウイルス)、トガウイルス(アルファウイルス、ルビウイルス、アルテリウイルス、ルベラウイルス)、ペスチウイルス(ブタコレラウイルス、ウシ下痢ウイルス)、パラミクソウイルス(パラインフルエンザウイルス 1, 2, 3, 4、イヌジステンパーウイルス、ニューカッスル病ウイルス、RSウイルス、リンダペストウイルス、サルパラインフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス)、オルソクソウイルス(ヒトインフルエンザウイルス、トリインフルエンザウイルス、ウマインフルエンザウイルス、ブタインフルエンザウイルス)、ラブドウイルス(狂犬病ウイ

ルス、水泡性口内炎ウイルス）、ピコルナウイルス（ポリオウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルス、ウシエンテロウイルス、ブタエンテロウイルス、サルエンテロウイルス、マウス脳脊髄炎ウイルス、ヒトライノウイルス、ウシライノウイルス、ウマライノウイルス、口蹄疫ウイルス、A型肝炎ウイルス）、コロナウイルス（ヒトコロナウイルス、ニワトリ伝染性気管支炎ウイルス、マウス肝炎ウイルス、豚伝染性胃腸炎ウイルス）、アレナウイルス（リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、ラサウイルス、韓国型出血熱ウイルス）、レトロウイルス（HTLV：ヒト成人白血病ウイルス、HIV：エイズウイルス、ネコ白血病肉腫ウイルス、牛白血病ウイルス、ラウス肉腫ウイルス）、レオウイルス（ロタウイルス）、カリシウイルス（ノーウオークウイルス）、ブンヤウイルス（腎症候性出血熱ウイルス）、フィロウイルス（エボラウイルス、マールブルグウイルス）、B型肝炎ウイルス（HBV）、ポックスウイルス（ワクシニアウイルス、アラストリウムウイルス、牛痘ウイルス、天然痘ウイルス）、パルボウイルス（ヒトパルボウイルス、豚パルボウイルス、牛パルボウイルス、犬パルボウイルス、ネコ白血球減少症ウイルス、ミンクアリュウシャン病ウイルス）、パポーバウイルス（パピローマウイルス、ポリオーマウイルス）、アデノウイルス、ヘルペスウイルス（単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、EBウイルス、馬ヘルペスウイルス、ネコヘルペスウイルス、マレック病ウイルス）又はアフリカ豚コレラウイルスである請求項9に記載の方法。

11. 前記ウイルスがC型肝炎ウイルス（HCV）又はB型肝炎ウイルス（HBV）である、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

12. 請求項1～10のいずれか1項に記載の検体処理方法を用い

て、ウイルス抗原を特異的に認識するプローブを反応させることにより、ウイルス抗原の存在を検出又は定量することを特徴とするウイルスの測定方法。

13. HC 1 1 - 1 1 (FERM BP - 6 0 0 5), HC 1 1 - 1 4 (FERM BP - 6 0 0 6), HC 1 1 - 1 0 (FERM BP - 6 0 0 4), HC 1 1 - 3 (FERM BP - 6 0 0 2)、及びHC 1 1 - 7 (FERM BP - 6 0 0 3) から成る群から選択されるハイブリドーマ細胞株。

14. HC 1 1 - 1 1 (FERM BP - 6 0 0 5), HC 1 1 - 1 4 (FERM BP - 6 0 0 6), HC 1 1 - 1 0 (FERM BP - 6 0 0 4), HC 1 1 - 3 (FERM BP - 6 0 0 2), HC 1 1 - 7 (FERM BP - 6 0 0 3) から成る群から選択されるハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体。

15. 請求項 1 2 に記載の免疫測定方法に用いるための、陰イオン性界面活性剤を含んで成る、検体中のウイルスの有無を判別するキット、定量するキット又は診断薬。

16. 請求項 1 2 に記載の免疫測定方法に用いるための、請求項 1 4 に記載のモノクローナル抗体を含んでなる、検体中のウイルスの有無を判別するキット、定量するキット又は診断薬。

17. 請求項 1 2 に記載の免疫測定方法に用いるための、カオトロピック剤を含んで成る、検体中のウイルスの有無を判別するキット、定量するキット又は診断薬。

18. 請求項 1 2 に記載の免疫測定方法に用いるための、ハイブリドーマHC 1 1 - 1 4 (FERM BP - 6 0 0 6), HC 1 1 - 1 0 (FERM BP - 6 0 0 4) またはHC 1 1 - 1 1 (FERM BP - 6 0 0 5) により生産されるモノクローナル抗体を含んでなる、検体中のHCVの有無を判別するキット、定量するキット

又は診断薬。

19. 尿素、イミダゾール環含有化合物又はインドール環含有化合物をさらに含んで成る請求項 15～17 のいずれか 1 項に記載の診断キット。

20. 前記イミダゾール環含有化合物がイミダゾール、ヒスチジン、イミダゾールアクリル酸、イミダゾールカルボキシアリデヒド、イミダゾールカルボキサミド、イミダゾールジオン、イミダゾールジチオカルボン酸、イミダゾールジカルボン酸、イミダゾールメタノール、イミダゾリジンチオン、イミダゾリドン、ヒスタミン又はイミダゾピリジンである、請求項 19 に記載の診断キット。

21. 前記インドール環含有化合物がトリプトファン、インドールアクリル酸、インドール、インドール酢酸、インドール酢酸ヒドラジド、インドール酢酸メチルエステル、インドール酪酸、インドールアセトニトリル、インドールカルビノール、インドールカルボキシアリデヒド、インドールカルボン酸、インドールエタノール、インドール乳酸、インドールメタノール、インドールプロピオン酸、インドールピルビン酸、インドリルメチルケトン、インドーマイシン、インドールアセトン、インドメタシン、インドプロフェン、インドラミン酸である、請求項 19 に記載の診断キット。

22. ウイルスの測定方法において、炭素原子数 10 個以上のアルキル基と第 2、第 3 もしくは第 4 級アミンとを有する界面活性剤又は 12～14 の親水疎水比 (HLB) を有する非イオン界面活性剤、あるいはこの両者の存在下で、ウイルス抗原を、そのプローブとの結合により測定することを特徴とする方法。

23. 前記アルキル基と第 2、第 3 もしくは第 4 級アミンとを有する界面活性剤が、炭素原子数 10～20 個のアルキル基と第 3 級又は第 4 級アミンとを有する界面活性剤である、請求項 22 に記載の

方法。

24. 前記第3級又は第4級アミン界面活性剤が、ドデシル-N-サルコシン酸、セチルもしくはドデシルトリメチルアンモニウム塩、3-(ドデシルジメチルアンモニオ)-1-プロパンスルホン酸、ドデシルピリミジウム塩、又はデカノイル-N-メチルグルカミド(MEGA-10)である、請求項22又は23に記載の方法。

25. 前記非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル、又はポリオキシエチレンノニルフェニルエーテルである請求項23～24のいずれか1項に記載の方法。

26. 前記ウイルス抗原のためのプローブが、ウイルス抗原に対する抗体である、請求項22～25のいずれか1項に記載の方法。

27. 前記ウイルスが、ゲノムRNA又はDNAを包む構造蛋白質と、それを取り囲む膜蛋白質又は脂質膜から構成される構造を有するウイルス粒子を形成するウイルスである請求項22～26のいずれか1項に記載の方法。

28. 前記ウイルスが、C型肝炎ウイルス(HCV)、D型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、G型肝炎ウイルス、手足口病ウイルス、フラビウイルス(黄熱ウイルス、西ナイルウイルス、日本脳炎ウイルス、デングウイルス)、トガウイルス(アルファウイルス、ルビウイルス、アルテリウイルス、ルベラウイルス)、ペスチウイルス(ブタコレラウイルス、ウシ下痢ウイルス)、パラミクソウイルス(パラインフルエンザウイルス1, 2, 3, 4、イヌジステンパーウイルス、ニューカッスル病ウイルス、RSウイルス、リンダベストウイルス、サルパラインフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス)、オルソクソウイルス(ヒトインフルエンザウイルス、トリインフルエンザウイルス、ウマインフルエンザウイルス、ブタインフルエンザウイルス)、ラブドウイルス(狂犬病ウイ

ルス、水泡性口内炎ウイルス)、ピコルナウイルス(ポリオウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルス、ウシエンテロウイルス、ブタエンテロウイルス、サルエンテロウイルス、マウス脳脊髄炎ウイルス、ヒトライノウイルス、ウシライノウイルス、ウマライノウイルス、口蹄疫ウイルス、A型肝炎ウイルス)、コロナウイルス(ヒトコロナウイルス、ニワトリ伝染性気管支炎ウイルス、マウス肝炎ウイルス、豚伝染性胃腸炎ウイルス)、アレナウイルス(リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、ラサウイルス、韓国型出血熱ウイルス)、レトロウイルス(H T L V : ヒト成人白血病ウイルス、H I V : エイズウイルス、ネコ白血病肉腫ウイルス、牛白血病ウイルス、ラウス肉腫ウイルス)、レオウイルス(ロタウイルス)、カリシウイルス(ノーウオークウイルス)、ブンヤウイルス(腎症候性出血熱ウイルス)、フィロウイルス(エボラウイルス、マールブルグウイルス)、B型肝炎ウイルス(H B V)、ポックスウイルス(ワクシニアウイルス、アラストリウムウイルス、牛痘ウイルス、天然痘ウイルス)、パルボウイルス(ヒトパルボウイルス、豚パルボウイルス、牛パルボウイルス、犬パルボウイルス、ネコ白血球減少症ウイルス、ミンクアリューション病ウイルス)、パポーバウイルス(パピローマウイルス、ポリオーマウイルス)、アデノウイルス、ヘルペスウイルス(単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、E B ウイルス、馬ヘルペスウイルス、ネコヘルペスウイルス、マレック病ウイルス)又はアフリカ豚コレラウイルスである請求項27に記載の方法。

29. 前記ウイルスがC型肝炎ウイルス(H C V)又はB型肝炎ウイルス(H B V)である、請求項22~28のいずれか1項に記載の方法。

